

Posttranslationale Modifikation und subzelluläre Verteilung von Plakophilin 3 in normalen und Tumorzellen

**Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Steffen Neuber
aus
Frankenberg / Sachsen

Marburg / Lahn 2013

Die vorliegende Arbeit wurde vom Mai 2009 bis November 2012 im Institut für Pathologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. Roland Moll angefertigt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkennziffer 1080) als
Dissertation angenommen am: 29.April 2013

Erstgutachter: Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

Zweitgutachter: Prof. Dr. Roland Moll

Tag der mündlichen Prüfung am: 28.Mai 2013

Der Mensch hat dreierlei Wege klug zu handeln:

- 1. durch Nachdenken – das ist der edelste,**
- 2. durch Nachahmen – das ist der leichteste,**
- 3. durch Erfahrung – das ist der bitterste!**

– Laotse –

Abkürzungsverzeichnis	viii
1. Einleitung	1
1.1 Zell-Zell-Verbindungen	1
1.1.1 Tight Junctions	3
1.1.2 Gap Junctions	3
1.1.3 Adhärenzverbindungen	4
1.1.4 Desmosomen	5
1.2 Die Familie der Plakophiline	9
1.2.1 Plakophilin 1	9
1.2.2 Plakophilin 2	11
1.2.3 Plakophilin 3	12
1.2 Reversible Phosphorylierungen und Armadillo-Proteine	14
1.3 Die Familie der Src-Kinasen	16
1.4 Zielstellung	18
2. Material und Methoden	19
2.1 Biologische Materialien	19
2.1.1 Bakterielle Kulturen	19
2.1.2 Eukaryotische Kulturen	19
2.2 Vektoren	20
2.3 Enzyme	23
2.4 Wachstumsfaktoren und Inhibitoren	24
2.5 Kommerzielle Komplettsysteme	25
2.6 Chemikalien und Substanzen	25
2.7 Oligonukleotide	28
2.8 Antikörper	28
2.9 Geräte und Hilfsmittel	29
2.10 Tierexperimentelle Methoden	31
2.10.1 Immunisierung der Kaninchen	31
2.10.2 Gewinnung von Antiserum	31
2.11 Methoden der Zellkultur	32
2.11.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen	32
2.11.2 Behandlungen an eukaryotischen Zellen	32
2.11.3 Pervanadat-Präparation und –Behandlung eukaryotischer Zellen	32
2.11.4 Transfektion eukaryotischer Zellen	33
2.11.5 Methanol / Aceton Fixierung von Zellen	34
2.12 Molekularbiologische Methoden mit Nukleinsäuren	35
2.12.1 RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen	35
2.12.2 cDNA-Synthese	35
2.12.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35

2.12.4	in vitro orts-spezifische Mutagenese.....	36
2.12.5	TA-Klonierung.....	36
2.12.6	Restriktion von DNA.....	37
2.12.7	Ligation.....	38
2.12.8	Minipräparation von Plasmid-DNA.....	38
2.12.9	Maxipräparation von Plasmid-DNA.....	39
2.13	Molekularbiologische Arbeiten mit Proteinen.....	40
2.13.1	Affinitätsaufreinigung von polyklonalen Antisera an Peptid-gekoppelten Säulen.....	40
2.13.2	Gesamtproteinextraktion.....	40
2.13.3	Differentielle Proteinextraktion.....	41
2.13.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	41
2.13.5	Trichloressigsäure-Fällung von Proteinen (TCA-Fällung).....	42
2.13.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	42
2.13.7	Detektion von Proteinen und Western Blot.....	43
2.13.8	Immunoblotting.....	44
2.13.9	Immunfluoreszenzfärbung.....	44
2.13.10	Immunpräzipitation.....	45
2.13.11	in vitro Kinase-Assay.....	46
2.13.12	2D-Gelelektrophorese.....	47
2.13.13	Immunhistochemische Färbungen von Geweben.....	48
2.13.14	Expression des PKP3 N-Terminus in Escherichia coli.....	49
2.13.15	Screening von cDNA-Bibliotheken mit Hilfe Phosphorylierungs-spezifischer Antikörper.....	49
2.13.16	in vivo Exzision des pBluescript Phagemids mit einem Helfer Phagen.....	50
3.	Ergebnisse.....	52
3.1	Analyse von post-translationalen Modifikationen von Plakophilin 3.....	52
3.2	Nachweis der Tyrosin-Phosphorylierung von Plakophilin 3.....	54
3.3	Quantitative Tyrosin-Phosphorylierung von PKP3.....	55
3.4	Vektorkonstruktionen zur Analyse der Tyrosine am PKP3 N-Terminus.....	56
3.4.1	Mutationsvarianten und allgemeine Klonierungsstrategie.....	56
3.4.2	Konstruktion der S196A-Mutation.....	58
3.4.2.1	Mutagenese zur Konstruktion der S196A-Mutation.....	58
3.4.2.2	Konstruktion von pcDNA6 PKP3-CKT3-S196A.....	58
3.4.3	Konstruktion der Kombinationsmutante aus allen Phospho-Aminosäure-Mutationen.....	59
3.4.3.1	Konstruktion der Y195F-S196A-Doppelmutation.....	59
3.4.3.2	Erweiterung der Y195F-S196A-Mutante um die Mutation Y210F.....	59
3.4.3.3	Konstruktion von pBluescript R3-NPP3-Y176F-Y195F-S196A-Y210F.....	60
3.4.3.4	Konstruktion der pBluescript R3-NPP3-Y84F-Y390F-Mutante.....	60
3.4.3.5	Vereinigung aller sechs Mutationen in pBluescript R3-NPP3.....	61

3.4.4	Konstruktion des pcDNA6 PKP3-CKT3-Vektors mit allen Mutationen.....	61
3.5	Herstellung stabiler Linien	63
3.6	Analyse der PKP3-Phospho-Tyrosin-Mutanten	65
3.6.1	Einfluss der Tyrosin-Mutationen auf das Löslichkeitsverhalten von PKP3	65
3.6.2	Einfluss der Tyrosin-Mutationen auf die subzelluläre Verteilung von PKP3	68
3.7	Herstellung Phospho-Tyrosin-spezifischer Antikörper.....	69
3.7.1	Herstellung polyklonaler Antiseren.....	69
3.7.2	Aufreinigungsschema polyklonaler Antiseren.....	70
3.7.3	Charakterisierung der aufgereinigten Antiseren an Antigen-Peptiden.....	71
3.7.4	Charakterisierung der aufgereinigten Antiseren an verschiedenen Zelllinien	74
3.7.4.1	Charakterisierung des p-Y195-Antikörpers	74
3.7.4.2	Nachweis der Phospho-Tyrosin-Spezifität des p-Y195-Antikörpers an PKP3-transfizierten PLC-Zellen.....	76
3.8	Analyse der PKP3-Phosphorylierung an Tyrosin Y195.....	77
3.8.1	Stimulation mit dem Epidermalen Wachstumsfaktor EGF	77
3.8.2	Stimulation mit dem Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor IGF-1	79
3.8.3	Stimulation mit dem Hepatozyten Wachstumsfaktor HGF (Scatter Faktor).....	80
3.8.4	Charakterisierung der Phosphorylierung von PKP3 an Y195 durch Pervanadat-Behandlung.....	81
3.8.5	Einfluss von Src-Kinase-Inhibitoren auf Pervanadat-induzierte PKP3- Phosphorylierung an Y195	83
3.8.6	Stimulation von HaCaT-Zellen mit Wasserstoff-Peroxid.....	85
3.8.7	Nachweis der PKP3-Phosphorylierung an Y195 nach Wasserstoff-Peroxid-Behandlung.....	86
3.8.8	Analyse der Wasserstoff-Peroxid induzierten Phosphorylierung unter Src-Kinase-Inhibition	87
3.8.9	Differentielle Extraktion von PKP3 nach Wasserstoff-Peroxid-Behandlung.....	88
3.9	Vorbetrachtungen zum Screening einer cDNA-Bibliothek	89
3.9.1	Herstellung des PKP3-Expressionsplasmids und Präparation der Wirtsbakterien	89
3.10	Screening der cDNA-Bibliothek mit monoklonalen Phospho-Tyrosin-Antikörpern.....	90
3.11	Phosphorylierung von PKP3 an Y195 durch c-Src.....	92
3.11.1	<i>In vitro</i> Nachweis der Phosphorylierung von PKP3 an Y195 durch c-Src.....	92
3.11.2	<i>In vivo</i> Nachweis der Phosphorylierung von PKP3 an Y195 durch c-Src	94
3.12	Nachweis von Y195-phosphoryliertem PKP3 in Prostatatumoren	95
3.13	Anhang Ergebnisse.....	98
3.13.1	Charakterisierung des polyklonalen p-Y84-Antikörpers.....	98
3.13.2	Charakterisierung des polyklonalen p-Y210-Antikörpers.....	98
3.13.3	Charakterisierung des polyklonalen p-Y390-Antikörpers.....	101

4.	Diskussion	102
4.1	Phosphorylierungen modulieren die Eigenschaften von Zelladhäsions-Proteinen	102
4.2	PKP3 ist Ziel zellulärer Tyrosin-Kinasen, wobei der Phosphorylierung einzelner Tyrosin-Reste eine besondere Relevanz zukommt	103
4.3	Der PKP3 Tyrosin-Rest Y195 wird durch die c-Src-Kinase phosphoryliert	105
4.4	Zelluläre Wachstumsfaktoren haben keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von PKP3 am Tyrosin-Rest Y195	107
4.5	Wasserstoff-Peroxid induziert die Phosphorylierung von PKP3 am Tyrosin-Rest Y195	108
4.6	Modulieren Phosphorylierungen ebenfalls die Eigenschaften von PKP3?	109
4.7	Funktionelle Bedeutung der Phosphorylierung von PKP3 am Tyrosin-Rest Y195	111
5.	Zusammenfassung	115
6.	Literatur	119
7.	Anhang	134

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
Abschn	Abschnitt
bla	β -Lactamase
bp	Basenpaar
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dsc	Desmocollin
Dsg	Desmoglein
DSP	Desmoplakin
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktor
EMEM	Eagle's minimal essential medium
FKS	Fötales Kälberserum
H ₂ O ₂	Wasserstoff-Peroxid
HGF	Hepatozyten Wachstumsfaktor
IGF-1	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 1
JUP	junctional Plakoglobin
nt	Nukleotid
ori	Replikationsursprung (origin of replication)
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
pH	potentia Hydrogenii
pI	isoelektrischer Punkt
PKP	Plakophilin
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies (reactive oxygen species)
S	Serin
Tab	Tabelle
TCF	T-Zell Faktor (T-cell factor)
vgl	vergleiche
Y	Tyrosin

1. Einleitung

Die mehrzelligen Organismen zählen mehr als 1,2 Millionen Arten bis hin zu den am höchsten entwickelten Lebewesen der Erde. Die kontinuierliche Spezialisierung der Zellen mehrzelliger Organismen hat im Laufe der Evolution zur Bildung funktioneller Einheiten geführt, die sich in verschiedensten Zell- und Gewebstypen präsentieren. Die funktionelle Organisation der Zellen kann jedoch nur gewährleistet werden, wenn diese über hinreichende Interaktionsmöglichkeiten verfügen. Eine der fundamentalsten Möglichkeiten der direkten Zellinteraktion stellen Zell-Zell-Verbindungen dar. Bereits in den ursprünglichsten Formen der Abteilung der *Eumetazoa* kommen einzelne Strukturkomponenten symmetrischer Zellverbindungen vor und sind evolutionär deutlich konserviert [Hobmayer *et al.*, 1996]. Zell-Zell-Verbindungen legen den Grundstein für die korrekte Zusammensetzung, Funktion und Dynamik des mehrzelligen Organismus.

1.1 Zell-Zell-Verbindungen

Zell-Zell-Verbindungen sind interzelluläre Verbindungen zwischen benachbarten Zellen. In epithelialen und nicht-epithelialen Zellverbänden übernehmen sie verschiedenste Funktionen und vermitteln beispielsweise die Integrität von Geweben, regulieren die Genexpression der beteiligten Zellen und sind an der zellulären Signaltransduktion beteiligt. Ferner definieren sie die Polarität der Zelloberfläche und grenzen den Organismus von der ihn umgebenden Umwelt ab.

Die ersten mikroskopischen Beobachtungen von Zell-Zell-Verbindungsstrukturen gelangen dem italienischen Pathologen Giulio Bizzozero Ende des 19. Jahrhunderts [Bizzozero, 1864, 1870; vgl. Culkins *et al.*, 2007]. Die Einführung des Elektronenmikroskops gestattete genauere Studien der Zellmorphologie, und weitere Zell-Zell-Verbindungstypen wurden entdeckt [Farquhar *et al.*, 1963]. Heutzutage werden die unterschiedlichen Zell-Zell-Verbindungen anhand ihrer molekularen Zusammensetzung und ihrer strukturellen Morphologie im Elektronenmikroskop unterschieden. Tabelle 1.1 stellt die folgenden drei symmetrischen Kontakttypen, die innerhalb der Vertebraten abgegrenzt werden, vor:

Tabelle 1.1 Zell-Zell-Verbindungen der Vertebraten

Verschlusskontakte: Tight Junctions (<i>Zonulae occludentes</i>)	Vorkommen: epitheliale und endotheliale Zellen
Adhäsionskontakte: Desmosomen (<i>Maculae adhaerentes</i>) Adhärenzverbindungen – Adherens junctions (<i>Zonulae adhaerentes</i>)	Vorkommen: epitheliale Zellen, Kardiomyocyten, meningotheliale Zellen, dendritische Retikulumzellen von Thymus und Lymphknoten epitheliale und endotheliale Zellen, Kardiomyocyten, neuronale und mesenchymale Zellen
Kommunikationskontakte: Gap Junctions (<i>Maculae communicantes</i>)	Vorkommen: alle Gewebe-bildenden Zelltypen

Prinzipiell bestehen Zell-Zell-Verbindungen aus Transmembran-Proteinen, die homo- und heterophil mit ihrem Pendant auf benachbarten Zellen interagieren, und intrazellulär mit zytoplasmatischen Proteinen bzw. dem Zytoskelett assoziiert sind.

In polaren epithelialen Geweben kommen alle drei Kontakttypen in einer charakteristischen Vertikalverteilung vor, die in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt ist.

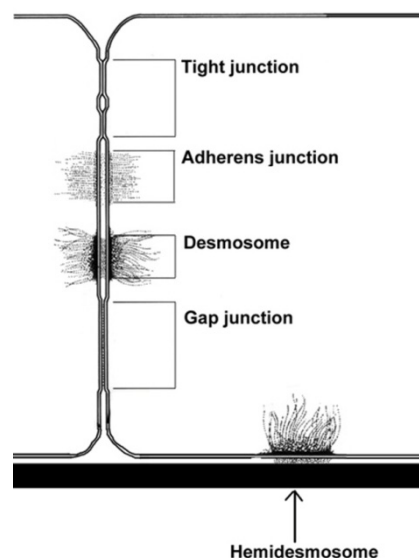


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Vertikalverteilung von Zell-Zell-Verbindungen. Die zellulären Kontakttypen zeigen in polarisierten Epithelien eine charakteristische Vertikalverteilung. Intrazellulär sind die Zell-Zell-Verbindungen mit unterschiedlichen Elementen des Zytoskeletts assoziiert. Abbildung modifiziert nach Ylä-Outinen [Ylä-Outinen, 2002].

Im apikalen Bereich der Epithelien treten primär Tight Junctions auf, die zugleich den Übergang zur lateralen Zelloberfläche markieren, die wiederum durch Adhärenzverbindungen und Desmosomen gekennzeichnet ist. Im basolateralen Bereich treten vermehrt Gap Junctions auf. Die im Basalbereich vorkommenden Hemidesmosomen verbinden die Epithelzellen mit der Basalmembran und gehören zu den Zell-Matrix-Verbindungen. Sie werden hier von den Zell-Zell-Verbindungen abgegrenzt.

1.1.1 Tight Junctions

Epitheliale Gewebe haben die wichtige Eigenschaft, unterschiedliche Kompartimente voneinander abzugrenzen. Tight Junctions sind ein essentieller Bestandteil dieser Barrierefunktion von Epithelien, weil sie eine selektiv-permeable Grenze schaffen, die den parazellulären Transport zwischen apikal und basolateral kontrolliert [van Itallie *et al.*, 2006]. Die Permeabilität für verschiedene Moleküle ist abhängig von deren Größe und Ladung, sowie von der molekularen Zusammensetzung der Tight Junction [Anderson *et al.*, 2004]. Darüber hinaus differenzieren die Tight Junctions die Plasmamembran in apikale und basolaterale Oberflächenbereiche, und definieren auf diese Weise die Zellpolarität in Epithelien [Nelson, 2003].

Die Transmembran-Domäne der Tight Junctions wird hauptsächlich durch Proteine der Claudinfamilie gebildet. Sie umfasst 24 Mitglieder, die eine ausgeprägte Organ- und Gewebespezifität aufweisen [Niessen, 2007]. Neben den Claudinen existieren weitere Transmembran-Proteine, wie dem Occludin bzw. den Immunglobulin-ähnlichen Adhäsionsverbindungen. Intrazellulär sind die Transmembran-Proteine mit den Zonula Occludens-Proteinen ZO-1 bis ZO-3 assoziiert, die eine Verbindung zum Aktinzytoskelett herstellen [Fanning *et al.*, 1998].

1.1.2 Gap Junctions

Gap Junctions sind einzigartige Zell-Zell-Verbindungen die eine direkte elektrische und metabolische Kommunikation der Zytoplasmata zwischen benachbarten Zellen ermöglichen. Sie kommen in nahezu allen Geweben vor und sind beteiligt an einer Vielzahl von Funktionen aus den Bereichen Homeostasis, Regeneration und Entwicklung. Die freie Diffusion gestattet den Austausch von Metaboliten, Ionen und anderen Molekülen, die den Kanal in Abhängigkeit ihrer Größe passieren können. In einem hochdynamischen Prozess können die Kanäle sowohl geöffnet als auch geschlossen werden [Goodenough *et al.*, 1996].

Die zugrunde liegenden Einheiten der Gap Junction sind Connexine, die in einer 21 Mitglieder zählenden Familie zusammengefasst werden. Da viele Zellen mehrere Connexintypen exprimieren, können diese zu homo- oder heteromeren Connexons auf einer Zelle oligomerisieren. Die Assemblierung der unterschiedlichen Connexine sowie deren Modifikation entscheidet über die physiologischen Eigenschaften der Gap Junction [Gaunt *et al.*, 1979; Giepmans, 2006]. Die Zusammenlagerung der Connexons zweier sich gegenüberstehender Zellen bildet dann einen Kanal, der beide Zytoplasmata verbindet und den kontrollierten Stoffaustausch ermöglicht. Zytoplasmatisch interagieren die Connexine mit Proteinen der Zell-Zell-Verbindungen (ZO-Proteine, β -Catenin), des Zytoskeletts (Mikrotubuli, Aktin) und Regulatoren (Kinasen, Phosphatasen) [Dbouk *et al.*, 2009].

1.1.3 Adhärenzverbindungen

Adhärenzverbindungen sind Haftkontakte unterschiedlicher Form, die als eine Art Kupplung die Aktinfilamentnetzwerke zweier benachbarter Zellen verbinden. Vermutungen über ihre Existenz und erste Untersuchungen von Adhärenzverbindungen gehen bereits auf die Arbeiten von Entwicklungsbiologen zu Beginn des 20. Jahrhunderts zurück [Wilson, 1907; vgl. Okada, 1996]. Adhärenzverbindungen verleihen den Geweben des Organismus Stabilität, welche einerseits essentiell ist für die Morphogenese und andererseits die Dynamik gegenüber äußeren und inneren Einflüssen gewährleistet [Harris *et al.*, 2010]. Am Beispiel des Epithels werden die funktionellen Eigenschaften von Adhärenzverbindungen besonders deutlich. Wie in Abbildung 1.1 dargestellt, befinden sich diese an den lateralen Zellgrenzen unter den Tight Junctions, und in der Gesamtheit des Epithels bilden sie einen durchgängigen Adhäsionsgürtel, den man als *zonula adhaerens* bezeichnet [Alberts *et al.*, 2009]. Im Zusammenspiel mit den Desmosomen verleiht diese strukturelle Einheit dem Epithel eine außerordentliche Widerstandsfähigkeit (siehe Abschn. 1.1.4).

Adhärenzverbindungen sind Calcium-abhängige Strukturen, und die Adhäsions-vermittelnden Proteine sind hier die Cadherine. Cadherine sind eine Familie von Transmembran-Glykoproteinen und zählen über 50 Mitglieder, die alle ein Gewebs-spezifisches Expressionsmuster zeigen [Takeichi, 1988; Meng *et al.*, 2009]. Die Adhäsion wird durch die Bindung von Calcium-Ionen in den extrazellulären Domänen (EC-Domäne) kontrolliert [Pokutta *et al.*, 1994]. Diese Domänen sind innerhalb der Familie hochkonserviert, allerdings weisen die zytoplasmatischen Sequenzen eine deutliche Diversität auf, weshalb die Familie in klassische und nicht-klassische Cadherine unterteilt wird [Niessen, 2007]. Die zu den klassischen Cadherinen zählenden E-, N- und P-Cadherine sind Hauptbestandteile der

Adhärenzverbindungen und interagieren homophil mit Cadherinen auf der angrenzenden Zelle. Zytoplasmatische Adapterproteine, die zur Familie der Armadillo-Proteine (p120-Catenin, β -Catenin, Plakoglobin) gehören, stellen die Verbindung zum Aktin-Zytoskelett her [Meng *et al.*, 2009]. Die nicht-klassischen Cadherine umfassen unter anderem die desmosomalen Cadherine. Diese werden im Zusammenhang mit den Desmosomen vorgestellt.

1.1.4 Desmosomen

Oberflächengewebe, wie die Haut oder die Mucosa des Dünndarms, werden permanent durch mechanischen Stress beansprucht. Damit die Integrität des Körpers aufrechterhalten werden kann, müssen epitheliale Gewebe widerstandsfähig sein. Neben den Adhärenzverbindungen (siehe Abschn. 1.1.3) vermitteln Desmosomen die notwendige Stabilität. Desmosomen werden sukzessive und nach dem Zusammenbau der Adhärenzverbindungen gebildet [Green *et al.*, 2009]. Bei der Embryogenese beispielsweise werden sie als letzte strukturelle Zell-Zell-Verbindungskomponente im trophoektodermalen Epithel aufgebaut [Holthöfer *et al.*, 2007]. Desmosomen sind Haftkontakte, die Intermediärfilamente des Zytoskeletts benachbarter Zellen verbinden. Das elektronenmikroskopische Bild der Desmosomen zeigt eine charakteristische Ultrastruktur und ist in Abbildung 1.2 dargestellt.

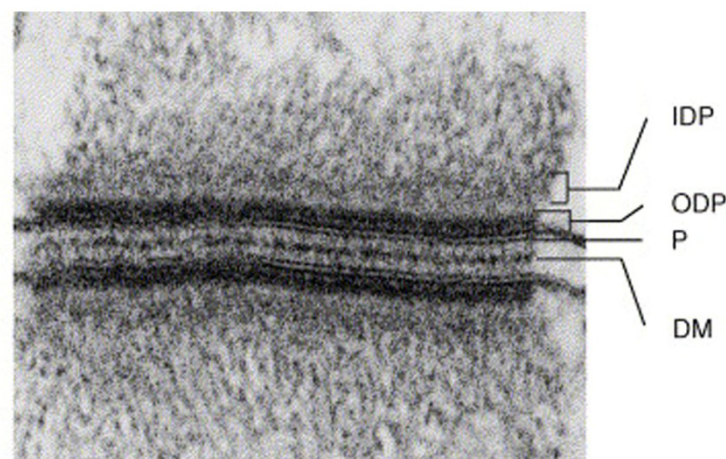


Abbildung 1.2: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Desmosoms.
Im extrazellulären Bereich zwischen den Plasmamembranen (P) befindet sich die *dense midline* (DM). Zytoplasmatisch wird der *outer dense plaque* (ODP) und der *inner dense plaque* (IDP) unterschieden.
Abbildung modifiziert nach Yin *et al.* [Yin *et al.*, 2004].

Die ultrastrukturelle Darstellung der Desmosomen erlaubt die Abgrenzung von drei spezifischen Regionen, die sich aus der Assemblierung der Transmembran-Proteine und der desmosomalen Plaque-Proteine ableiten. Die Struktur im extrazellulären Bereich wird als *dense midline* bezeichnet und kommt durch die Interaktion der Transmembran-Proteine

zustande. Die zytoplasmatischen Strukturen unterscheiden sich in einen *outer* und *inner dense plaque* und kennzeichnen die Interaktionsbereiche der desmosomalen Plaqueproteine mit den Transmembran-Proteinen bzw. den Intermediärfilamenten.

Der molekulare Aufbau der Desmosomen ähnelt in hohem Maße dem der Adhärenzverbindungen. Cadherine vermitteln auch im Desmosom die Adhäsion und sind intrazellulär mit Armadillo-Proteinen assoziiert. Plakine koppeln die Intermediärfilamente an die desmosomalen Plaquekomponenten. Die molekulare Zusammensetzung der Desmosomen ist in Abbildung 1.3 schematisch dargestellt.

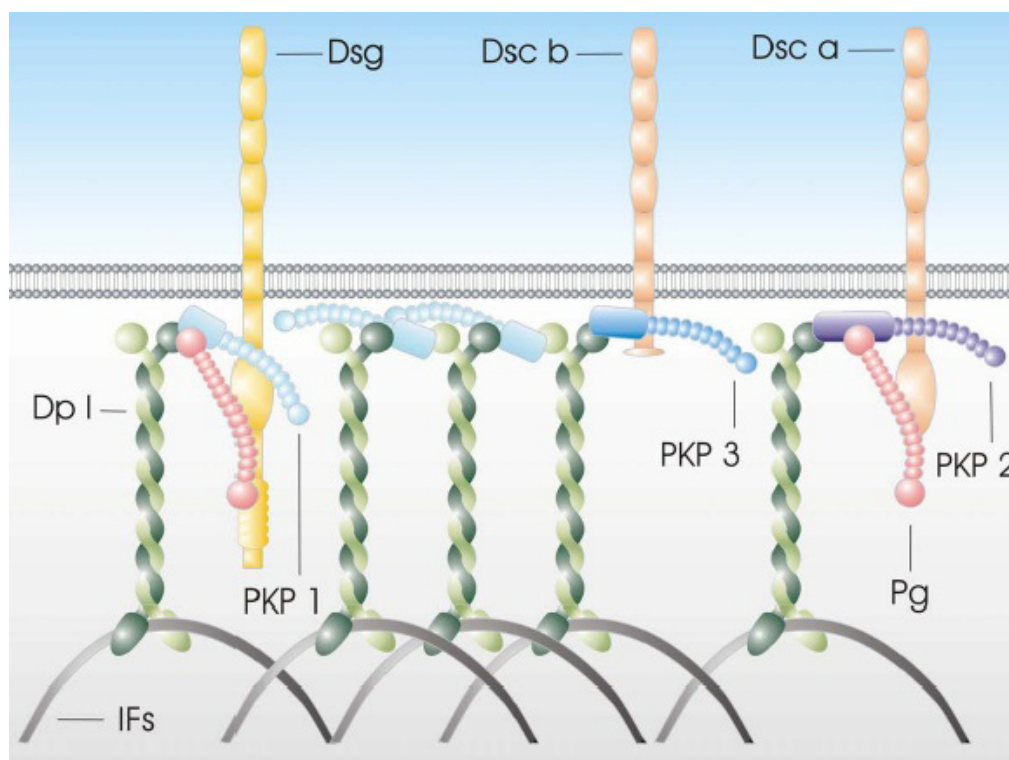


Abbildung 1.3: Schematische Organisation der Desmosomen.

Die interzelluläre Adhäsion der Desmosomen wird vermittelt durch Desmogleine (Dsg) und Desmocolline (Dsc). Zytoplasmatisch sind die desmosomalen Cadherine mit Plakoglobin (Pg) und Plakophilinen (PKP) assoziiert. PG und PKPs fungieren als Brückenproteine und verankern über die Interaktion mit Desmoplakin (DP) die Intermediärfilamente an den desmosomalen Plaque.

Abbildung modifiziert nach Schmidt *et al.* [Schmidt *et al.*, 2005].

- Desmosomale Cadherine -

Die desmosomalen Cadherine stimmen zu 30 % mit der Aminosäuresequenz der klassischen Cadherine überein. Diese Homologien sind allerdings beschränkt auf die extrazellulären EC-Domänen und eine kurze, zytoplasmatische Bindungsdomäne, die innerhalb der Familie hoch konserviert sind. Die humanen desmosomalen Cadherine werden in die Desmocolline (Dsc 1 – 3) und Desmogleine (Dsg 1 – 4) eingeteilt. Alle Gene liegen auf Chromosom 18 und sind

evolutionär vermutlich durch Genduplikationen entstanden. Desmosomale Cadherine werden in Abhängigkeit vom Zelltyp und vom Differenzierungsgrad des Gewebes exprimiert [Dusek *et al.*, 2007]. Die Desmocolline werden in „a“- und „b“-Formen unterteilt, die aus alternativen Spleiß-Vorgängen hervorgehen. Desmosomale Cadherine können sowohl homo- als auch heterophile Interaktionen eingehen [Getsios *et al.*, 2004]. Außerdem können in den EC-Domänen Calcium-Ionen gebunden werden, wodurch die Zellen in einen hyperadhäsiven Zustand der Calcium-Unabhängigkeit übergehen [Garrod *et al.*, 2008 a]. Die zytoplasmatische Domäne der desmosomalen Cadherine ist durch verschiedene Bindemotive gekennzeichnet. Einzelne Funktionen der Subdomänen sind bereits charakterisiert, allerdings fehlt für die Mehrzahl der Motive eine hinreichend detaillierte Untersuchung. In diesem Bereich interagieren die desmosomalen Plaqueprotein Plakoglobin und die Plakophiline.

- Armadillo-Proteine -

Namensgebend für diese Protein-Familie sind die aus 42 Aminosäuren bestehenden armadillo-Wiederholungen, welche die Struktur von drei α -Helices besitzen [Choi *et al.*, 2005]. Armadillo-Proteine weisen mehrfache Wiederholung dieser Motive („armadillo repeats“) auf, wodurch eine Superhelix entsteht, die sowohl positiv als auch negativ geladene Bereiche trägt. Durch diese unterschiedlichen Ladungsbereiche können in den armadillo repeats verschiedene basische und saure Proteine interagieren. In den Desmosomen werden Armadillo-Proteine durch Plakoglobin und die Plakophiline repräsentiert.

Plakoglobin (JUP; junktionales Plakoglobin) besteht aus zwölf sich wiederholenden armadillo repeats, die von amino- und carboxy-terminalen Domänen flankiert werden [Peifer *et al.*, 1992]. JUP kommt sowohl in den Adhärenz-Verbindungen als auch in den Desmosomen vor, wobei Interaktions-Studien eine stärkere Tendenz des Moleküls in Richtung der desmosomalen Cadherine aufzeigen [Chitaev *et al.*, 1996]. Eine Vielzahl von Liganden interagiert im Bereich der armadillo repeats. Für die Bindung der desmosomalen Cadherine spielt darüber hinaus auch die amino-terminale Domäne eine Rolle [Wahl *et al.*, 1996]. Durch die Assoziation mit Desmoplakin fungiert Plakoglobin als Mediator für die Verbindung der desmosomalen Cadherine mit den Intermediärfilamenten [Kowalczyk *et al.*, 1997]. Die Interaktionen mit weiteren desmosomalen Komponenten, wie beispielsweise den Plakophilinen, wurden bereits beschrieben, allerdings ist deren funktionelle Bedeutung noch nicht vollständig verstanden [Bonné *et al.*, 2003].

JUP kann darüber hinaus in den Zellkern überwechseln und als Regulator für Transkriptionsfaktoren der TCF-Familie (T-cell factor) wirken [Maeda *et al.*, 2004]. In diesem Zusammenhang moduliert JUP den Wnt-Signalweg, wobei ihm eine Rolle als Onkogen zugeschrieben wird [Dusek *et al.*, 2011]. Die genauen Hintergründe dieses Prozesses und die antagonistische Wirkung von JUP gegenüber β -Catenin sind Gegenstand der aktuellen Forschung und zu weiten Teilen ungeklärt.

Plakophiline assoziieren ebenfalls mit Desmoplakin und sorgen als Brückenproteine für die Verbindung der desmosomalen Cadherine mit den Intermediärfilamenten. Die Familie der Plakophiline wird in den folgenden Kapiteln ausführlich vorgestellt (siehe Abschn. 1.2).

- Desmoplakin -

Desmoplakin gehört aufgrund von Sequenz-Ähnlichkeiten zur Familie der Plakine [Mueller *et al.*, 1983]. Die Familie ist durch konservierte Plakin-Domänen charakterisiert, welche die Interaktionen zwischen Membran-Proteinen und Proteinen des Zytoskeletts vermitteln. Neben drei aufeinander folgenden Plakin-Domänen besteht Desmoplakin aus einer globulären Kopf-Domäne, einer zentralen Domäne mit der Struktur einer α -Helix und einer C-terminalen Domäne (GSR), welche reich an den Aminosäuren Glycin, Serin und Arginin ist. Als Ergebnis von Spleiß-Vorgängen existiert Desmoplakin in zwei Isoformen, die sich lediglich in der Länge der zentralen α -Helix unterscheiden. Mit einigen Ausnahmen werden beide Varianten in nahezu allen Desmosomen-haltigen Geweben exprimiert [Angst *et al.*, 1990]. Wie bereits erwähnt, stellen Desmoplakin und die desmosomalen Plaque-Proteine die Schnittstelle für die Verbindung der desmosomalen Cadherine mit den Intermediärfilamenten dar. In diesem Prozess assoziieren Plakoglobin und die Plakophiline mit der N-terminalen Kopf-Domäne des Desmoplakins [Bornslaeger *et al.*, 2001]. Die Keratine des Intermediärfilament-Netzwerks binden am entgegengesetzten Ende des Moleküls, wobei die Interaktionen durch die Plakin-Domänen und die GSR-Domäne reguliert werden [Choi *et al.*, 2002].

1.2. Die Familie der Plakophiline

Die Familie der Plakophiline umfasst drei verwandte Proteine (PKP1-3), die zur Familie der Armadillo-Proteine zählen [Neuber *et al.*, 2010]. Aufgrund von Aminosäuresequenz-Homologien von etwa 50 % werden die Plakophiline heute zur Gruppe der p120-Catenine gezählt [Hatzfeld, 2005]. Plakophiline weisen eine Domäne von neun aufeinander folgenden Armadillo-Wiederholungen auf. Zwischen der fünften und sechsten Wiederholung befindet sich eine Spacer-Sequenz, die zu einer charakteristischen Krümmung der Proteinstruktur führt [Choi *et al.*, 2005]. Im Gegensatz zu den armadillo-Domänen existieren zwischen den N-terminalen Kopfbereichen der Plakophiline keine Homologien. Lediglich eine kurze Sequenz, welche als homologe Region 2 (HR2) bezeichnet wird, zeigt zu einem gewissen Teil eine Übereinstimmung zwischen den drei Plakophilinen.

Plakophiline fungieren ähnlich dem Plakoglobin als desmosomale Adapterproteine und werden in einem Gewebs- und Differenzierungs-spezifischen Muster exprimiert [Schwarz *et al.*, 2006]. Plakophiline sind essentiell für die Assemblierung und Integrität der Desmosomen, was sich besonders durch erbliche Mutationen - sowohl rezessive als auch dominante – zeigt, die aufgrund einer fehlenden oder fehlerhaften Funktion eines Plakophilins mit der Entstehung von bestimmten Krankheiten assoziiert sind [McGrath *et al.*, 1999; Gerull *et al.*, 2004].

1.2.1 Plakophilin 1

PKP1 wurde als erster Vertreter der Plakophilin-Familie beschrieben und ursprünglich als Bande 6-Protein bezeichnet [Schmidt *et al.*, 1994]. Plakophilin 1 hat ein abgeleitetes Molekulargewicht von 80 kDa und einen äußerst basischen isoelektrischen Punkt von 9,3. Das PKP1-Gen lokalisiert beim Menschen auf Chromosom 1q32, hat eine Größe von 50 kbp und besteht aus 15 Exons [Schmidt *et al.*, 1999]. In Northern Blot Experimenten wurde festgestellt, dass ausgehend von diesem Gen durch unterschiedliche Poly-Adenylierungs-Vorgänge zwei verschiedene mRNAs transkribiert werden [Heid *et al.*, 1994]. Darüber hinaus werden durch alternatives Spleißen zwei PKP1-Isoformen prozessiert [Schmidt *et al.*, 1997]. PKP1b exprimiert 21 zusätzliche Aminosäuren, die durch Exon 7 kodiert werden und in PKP1a nicht vorkommen. Diese alternative Expression von Exon 7 hat Auswirkungen auf das Molekulargewicht (PKP1b – 82 kDa) und die subzelluläre Verteilung beider Moleküle. PKP1a lokalisiert primär in den Desmosomen, kann allerdings regelmäßig auch im Zellkern nachgewiesen werden. PKP1b hingegen befindet sich ausschließlich im Zellkern und zeigt keine desmosomale Lokalisation. Obwohl die Grundlagen dieses Translokations-

Mechanismus noch nicht im Detail verstanden sind, konnte einzelnen PKP1-Domänen bereits eine funktionelle Relevanz hierfür zugeordnet werden [Klymkowsky, 1999; Sobolik-Delmaire *et al.*, 2010].

PKP1 zeigt ein Differenzierungs-spezifisches Expressionsmuster und kommt in den Desmosomen mehrschichtiger Epithelien vor [Desai *et al.*, 2009]. In Übergangsepithelien, wie beispielsweise dem Urothel der ableitenden Harnwege, konnte es ebenfalls nachgewiesen werden. Die Desmosomen einschichtiger Epithelien zeigen kein PKP1. Im desmosomalen Kontext interagiert PKP1 mit Desmocollin 1, Desmoglein 1, Desmoplakin und Keratinen [Hatzfeld, 2007]. Diese Interaktionen werden durch die Kopf-Domäne von PKP1 vermittelt und verstärken die Akkumulation desmosomaler Proteine an der Zellmembran [Hatzfeld *et al.*, 2000; Sobolik-Delmaire *et al.*, 2006]. In den Desmosomen fördert PKP1 in Kooperation mit Plakoglobin den Zusammenhalt des desmosomalen Plaques, wobei sich die Interaktionen beider Moleküle teilweise mit anderen desmosomalen Proteinen überlagern [Bornslaeger *et al.*, 2001].

Wie bereits angedeutet, lokalisiert PKP1 nicht ausschließlich in den Desmosomen, sondern zeigt auch eine ausgeprägte nukleäre Lokalisation. Kürzlich konnten dieser extra-desmosomalen Rolle mehrere funktionelle Bedeutungen zugeordnet werden, die die zelluläre Relevanz von PKP1 entscheidend erweitern. So konnten Wolf *et al.* zeigen, dass PKP1 mit dem eukaryotischen Translationsinitiations-Faktor eIF4A1 interagiert und infolgedessen die Translation stimuliert [Wolf *et al.*, 2010]. Des Weiteren wurde die Bindung von PKP1 an einzelsträngige DNA gezeigt. Obwohl die genaue Funktion von PKP1 in diesem Kontext noch nicht geklärt wurde, lässt sich womöglich ein Zusammenhang mit DNA-Reparatur-Mechanismen erkennen [Sobolik-Delmaire *et al.*, 2010].

Die funktionelle Charakterisierung von PKP1 geht mit der Entdeckung des Ektodermalen Dysplasie-fragilen Haut-Syndroms (EDSF) einher. Diese autosomal-rezessiv vererbte Krankheit wird hervorgerufen durch Mutationen im PKP1-Gen, die zum Funktionsverlust des Proteins führen [McGrath *et al.*, 1997]. Elektronenmikroskopisch führt dies zu einer verringerten Anbindung von Keratin-Filamenten an die Desmosomen. Außerdem sind die Anzahl und die Größe der Desmosomen drastisch reduziert [McMillian *et al.*, 2003]. Klinisch und pathologisch äußert sich der desmosomale Adhäsionsverlust in einer Blasenbildung der Haut und der verstärkten Erosion der Epidermis. An Fußsohlen und Handflächen bilden sich

Hyperkeratosen, und der Haarwuchs ist stark vermindert. Die Nägel sind dystroph. Alle weiteren Epithelien zeigen keine Auffälligkeiten und lassen vermuten, dass der Funktionsverlust von PKP1 zumindest teilweise durch andere Plakophiline kompensiert werden kann.

1.2.2 Plakophilin 2

Das abgeleitete Molekulargewicht von Plakophilin 2 (PKP2) beträgt 97 kDa und der isoelektrische Punkt liegt bei einem pH-Wert von 9,4. PKP2 ist beim Menschen auf Chromosom 12p11 kodiert. Das Gen umfasst etwa 175 kbp und setzt sich aus 14 Exons zusammen [Schmidt *et al.*, 2005]. PKP2 existiert ebenfalls in zwei Isoformen (PKP2a und PKP2b). Als Resultat unterschiedlicher Spleiß-Prozesse fehlt PKP2a ein 44 Aminosäuren umfassendes Exon im Bereich der Armadillo-Domänen. Im Gegensatz zu PKP1 werden beide Isoformen in allen bisher untersuchten Zelllinien homogen exprimiert und lokalisieren sowohl in den Desmosomen als auch im Zellkern [Mertens *et al.*, 1996]. In Zelllinien, die keine Desmosomen ausbilden, findet sich PKP2 ausschließlich im Zellkern. Die Translokation von PKP2 in den Nukleus ist bereits aufgeklärt und wird in Abschnitt 1.3 näher erläutert.

PKP2 kommt in einschichtigen, komplexen und mehrschichtigen Epithelien vor. Ähnlich PKP1 zeigt PKP2 in mehrschichtigen Epithelien ein Differenzierungs-spezifisches Expressionsmuster [Desai *et al.*, 2009]. In einigen Epithelien wie beispielsweise dem Leberepithel und dem nicht-epithelialen Myokard ist PKP2 das einzige vorkommende Plakophilin [Grossmann *et al.*, 2004]. Außerdem wurde PKP2 in aktuellen Arbeiten häufig als Bestandteil bisher unbekannter und komplex zusammengesetzter Zell-Zell-Verbindungen beschrieben [Franke *et al.*, 2009]. PKP2 interagiert mit vielen anderen desmosomalen Proteinen, wobei alle bisher beschriebenen Interaktionen durch die Kopf-Domäne vermittelt werden [Chen *et al.*, 2002; Hatzfeld, 2007]. Für den Transport von Desmoplakin zur Plasmamembran und die Integration in die Desmosomen scheint PKP2 essentiell [Bass-Zubeck *et al.*, 2008; Green *et al.*, 2009].

Die extra-desmosomale Lokalisation von PKP2 ist in mehreren Arbeiten ausgeführt. So konnte PKP2 als Interaktionspartner der großen Untereinheit der RNA-Polymerase III im Zellkern beschrieben werden [Mertens *et al.*, 2001]. Obwohl in diesem Komplex weitere Transkriptionsfaktoren eingebunden sind, vermuten Mertens *et al.* keinen aktiven Enzymkomplex, weshalb die eigentliche Funktion von PKP2 im Pol III-Komplex unklar

bleibt. Darüber hinaus wird für PKP2 eine Einbindung in den Wnt-Signalweg diskutiert. Hierbei führt die Interaktion mit β -Catenin zu einer gesteigerten Aktivität der β -Catenin / TCF-Signalkaskade und gleichzeitig zu einer verminderten Assoziation mit E-Cadherin [Chen *et al.*, 2002].

Analysen von PKP2 erbrachten, dass Mutationen im menschlichen Gen mit der arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie (ARVC) korrelieren [Gerull *et al.*, 2004]. Diese autosomal-dominante Erbkrankheit führt zu einer gestörten interzellulären Adhäsion zwischen den Kardiomyozyten. Genetische Grundlagen dieser Erkrankung sind neben genomischen Deletionen im Bereich des PKP2-Gens auch Punktmutationen, die zum Funktionsverlust führen [Roberts *et al.*, 2012; Kirchner *et al.*, 2012]. Neben PKP2 sind Mutationen weiterer desmosomaler Gene (DSG2, DSC2, DSP und Plakoglobin) als Auslöser dieser Krankheit bekannt [Azaouagh *et al.*, 2011]. Weitere funktionelle Studien an PKP2 wurden mit Hilfe von knockout Mäusen durchgeführt. Hier führt das Fehlen von Pkp2 bereits im zweiten Trimenon zu einem letalen Phänotyp, der mit schwerwiegenden Störungen bei der Ausbildung der Herzmorphologie zusammenhängt [Grossmann *et al.*, 2004]. Andere Organe zeigen keine pathologischen Veränderungen.

1.2.3 Plakophilin 3

Plakophilin 3 (PKP3) wurde als letztes der drei Plakophiline beschrieben und hat ein abgeleitetes Molekulargewicht von 87 kDa [Schmidt *et al.*, 1999]. Wie die beiden anderen Plakophiline hat auch PKP3 einen außerordentlich basischen isoelektrischen Punkt von 9,39. Das PKP3-Gen lokalisiert beim Menschen auf Chromosom 11p15 und umfasst 13 Exons. PKP3 wird in zwei Isoformen exprimiert (PKP3a und PKP3b), die auf der Transkription von zwei unterschiedlichen Promotoren beruhen (M. Mühmer, persönliche Mitteilung). Die erst kürzlich beschriebene b-Variante unterscheidet sich von der a-Variante durch 23 zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus. PKP3 lokalisiert in den Desmosomen und kolokalisiert je nach Zelltyp mit PKP1 und / oder PKP2. Darüber hinaus wird das Protein auch im Zytoplasma nachgewiesen. Obwohl eine nukleäre Lokalisation von PKP3 in einigen epithelialen Zelllinien gezeigt wurde, ist diese weiterhin umstritten [vgl. Schmidt *et al.*, 1999 und Bonné *et al.*, 1999].

PKP3 wird in fast allen einfachen und allen untersuchten mehrschichtigen Epithelien exprimiert [Desai *et al.*, 2009]. Zellen des Leberepithels und des Myokards sind PKP3-

negativ. PKP3 interagiert mit dem größten Repertoire desmosomaler Proteine, wobei sowohl die Kopf- als auch die armadillo-Domäne für diese Interaktionen notwendig erscheinen [Bonné *et al.*, 2003; Hatzfeld, 2007]. PKP3 ist bisher der einzige identifizierte Interaktionspartner der Desmocollin-b-Isoformen [Bonné *et al.*, 2003].

Wie für die beiden anderen Plakophiline wurden auch für PKP3 mehrere extra-desmosomale Interaktionspartner identifiziert, die eine breitere biologische Signifikanz des Moleküls erahnen lassen. So kopräzipitiert und kolokalisiert PKP3 mit den RNA-bindenden Proteinen PABPC1 (Poly-A-bindendes Protein C1), FXR1 (Fragile X mental Retardation-1) und G3BP (GAP SH3-Domänen-bindendes Protein) unter Umweltstressbedingungen in Stressgranula [Hofmann *et al.*, 2006]. Hierbei handelt es sich um zytoplasmatische granuläre Aggregate, die als Antwort auf unterschiedliche Umweltfaktoren gebildet werden (oxidativer Stress, Schwermetalle und weitere) und sich aus mRNAs und verschiedenen Translations-Initiationsfaktoren zusammensetzen [Kedersha *et al.*, 2002]. In bestimmten Anteilen der Stressgranula wird die „cap“-abhängige Translation unter Stress angehalten.

Darüber hinaus ist PKP3 als Interaktionspartner des Dynamin-ähnlichen Proteins DNM-1L beschrieben worden [Furukawa *et al.*, 2005]. Dieses Protein ist beteiligt bei Teilungs- und Fusionsprozessen von peroxisomalen und mitochondrialen Zellorganellen und spielt bei der Zellapoptose eine Rolle [Smirnova *et al.*, 2001; Koch *et al.*, 2003]. Die Funktion von PKP3 ist in den genannten Zusammenhängen bisher ungeklärt.

Funktionell konnte PKP3 mit Hilfe einer knockout Maus charakterisiert werden [Sklyarova *et al.*, 2008]. Hier wurden morphologische und morphogenetische Defekte in bestimmten Haarfollikeln beobachtet und eine erhöhte Anfälligkeit für Entzündungen in der Haut festgestellt. Der eher milde Phänotyp ergibt sich wahrscheinlich aus dem kompensatorischen Wirken der weiteren Plakophiline, die in vielen Epithelien ko-exprimiert werden. Erkrankungen, die sich auf genetische PKP3-Defekte zurückführen lassen, sind bisher nicht bekannt.

1.3 Reversible Phosphorylierungen und Armadillo-Proteine

Reversible Phosphorylierungen an Serin-, Threonin- und Tyrosin-Resten sind an vielen Armadillo-Proteinen gefunden wurden und tragen in hohem Maße zur Definition ihrer spezifischen Eigenschaften bei. Ein fein abgestimmtes Gleichgewicht von Kinasen und Phosphatasen gestattet eine dynamische Modulation der Moleküleigenschaften und hat somit direkte Auswirkungen auf die adhäsiven Eigenschaften der Zell-Zell-Verbindungsstruktur.

Für p120-Catenin konnten bisher neun Tyrosin-Reste und acht Serin- / Threonin-Reste als Ziel zellulärer Kinasen identifiziert werden [Pieters *et al.*, 2012]. Die gefunden Phosphorylierungsstellen befinden sich alle im N-terminalen Bereich des Proteins. Nahezu alle Serin- und Threonin-Reste sind konstitutiv phosphoryliert, können allerdings als Reaktion auf zelluläre Stimuli vorübergehend dephosphoryliert werden [Ratcliffe *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 2000]. Lediglich S879 wird durch die Protein Kinase C infolge einer Phorbol ester-Behandlung direkt phosphoryliert [Xia *et al.*, 2003]. Tyrosin-Phosphorylierungen können ausschließlich transient als Reaktion auf Wachstumsfaktoren nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung spezifischer Tyrosin-Reste wird hierbei durch Kinasen der Src-Familie und verschiedene Rezeptor-Tyrosin-Kinasen katalysiert [Reynolds *et al.*, 1992; Mariner *et al.*, 2004]. Die schnelle Dephosphorylierung von p120-Catenin wird durch die Interaktion mit spezifischen Phosphatasen erreicht [Frank *et al.*, 2004]. Funktionell haben die Phosphorylierungen der Serin- und Threonin-Reste keinen Einfluss auf die Integrität der Adhärenz-Verbindungen. Im Gegensatz dazu führen Tyrosin-Phosphorylierungen von p120-Catenin in Src-transformierten Zellen zu deren Schwächung [Ozawa *et al.*, 2001]. Die molekularen Grundlagen dieser Beobachtungen sind noch nicht vollständig verstanden, umfassen aber anscheinend weitere Faktoren, die für die Regulation des p120-Catenin-Cadherin-Komplexes und zusätzliche Funktionen von p120-Catenin verantwortlich sind [Casagolda *et al.*, 2010].

Für β -Catenin ist der Zusammenhang zwischen Tyrosin-Phosphorylierungen und den damit einhergehenden Veränderungen der Moleküleigenschaften weitergehend untersucht. Hier ist gezeigt worden, dass die Phosphorylierung von Y654 durch den Rezeptor des Epidermalen Wachstumsfaktors die Affinität zu E-Cadherin und N-Cadherin vermindert, wodurch die Zell-Zell-Verbindung gestört wird [Roura *et al.*, 1995; Balsamo *et al.*, 1996; Miravet *et al.*, 2003]. Molekulare Grundlage dieser Beobachtung sind veränderte Ladungsverhältnisse im Bereich der Interaktionsdomänen durch die Einführung der negativ geladenen Phosphatgruppe [Huber *et al.*, 1997]. Die Phosphorylierung von Y142 hat ebenfalls einen Einfluss auf die

Bindeeigenschaften von β -Catenin. Diese Phosphorylierung führt zum Interaktionsverlust mit α -Catenin und wird durch die Kinasen Fyn und Fer katalysiert. Da die beiden Phosphorylierungs-Ereignisse direkte Auswirkungen auf die Integrität der Adhärenz-Verbindung haben, müssen diese exakt kontrolliert werden. Ermöglicht wird dies durch Tyrosin-Phosphatasen, die ebenfalls an den β -Catenin-Cadherin-Komplex gebunden sind und den Phosphorylierungs-Zustand der akzessorischen Moleküle regulieren [Xu *et al.*, 2004]. In *in vitro* Studien ist darüber hinaus gezeigt worden, dass die c-Src-Kinase den Tyrosin-Rest Y86 phosphoryliert [Roura *et al.*, 1999]. Die physiologische Funktion dieser Modifikation ist bisher jedoch nicht aufgeklärt.

Plakoglobin – Bestandteil der Adhärenz-Verbindungen und der Desmosomen – wird ebenfalls an mehreren Tyrosin-Resten phosphoryliert, woraufhin dessen molekulare Eigenschaften modifiziert werden. Die folgende Abbildung gibt einen Überblick über die bisher bekannten post-translationalen Modifikationen von Plakoglobin und stellt die damit einhergehenden funktionellen Veränderungen dar.

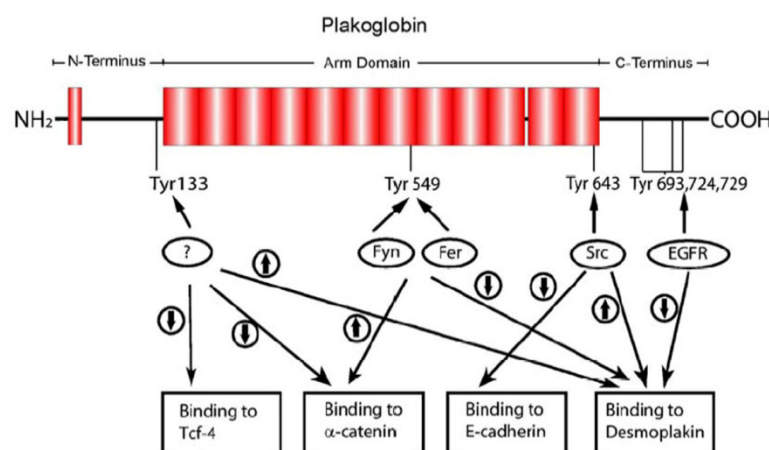


Abbildung 1.4: Übersicht über die bisherigen Phosphorylierungsstudien an Plakoglobin.

In allen JUP-Domänen konnten bisher phosphorylierte Tyrosinreste identifiziert werden, die die Interaktionen mit anderen Molekülen beeinflussen. Die Phosphorylierungen regulieren hoch-spezifisch die Funktionen von Plakoglobin als Bestandteil der Desmosomen oder der Adhärenz-Verbindungen. Darüber hinaus wird ebenfalls die Signalfunktion des Moleküls gesteuert.

Abbildung modifiziert nach Yin *et al.* [Yin *et al.*, 2004].

Die Phosphorylierung der Tyrosin-Reste Y693, Y742 und Y729 wird durch den Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor katalysiert und führt zur Translokation des Moleküls ins Zytoplasma [Miravet *et al.*, 2003]. Auf molekularer Ebene hat diese Modifikation eine verminderte Interaktion mit Desmoplakin zur Folge, weshalb Plakoglobin eine verringerte Assoziation mit der desmosomalen Struktur aufweist [Gaudry *et al.*, 2001]. Darüber hinaus wurde Plakoglobin als Substrat der Kinasen Fyn und Fer beschrieben, welche die

Phosphorylierung des Tyrosin-Restes Y549 katalysieren. Funktionell wird durch diese Phosphorylierung die Assoziation mit α -Catenin verstärkt und zugleich die Interaktion mit Desmoplakin vermindert. Diese Reaktion steht in Konkurrenz mit der Phosphorylierung des Tyrosin-Restes Y643 durch die c-Src-Kinase, die einen gegenteiligen Effekt auf die Eigenschaften von Plakoglobin hat. Die Phosphorylierung des Tyrosin-Restes Y133 wird in der Literatur ebenfalls diskutiert, kann allerdings nach bisherigem Kenntnisstand noch nicht mit einer funktionellen Veränderung verbunden werden [Miravet *et al.*, 2003]. Grundsätzlich zeigen die bisherigen Studien an Plakoglobin ein fein abgestimmtes Zusammenspiel unterschiedlicher Phosphorylierungs-Zustände, welche die Lokalisation des Moleküls beeinflussen und damit die Adhäsion der jeweiligen Zell-Zell-Verbindung modulieren.

Bei den Plakophilinen konnte bisher lediglich für PKP2 die Phosphorylierung des Serin-Restes S82 durch die Cdc25C-assoziierte Kinase 1 (C-TAK1) beschrieben werden [Müller *et al.*, 2003]. Diese Phosphorylierung generiert ein 14-3-3-Bindemotiv, wodurch die intrazelluläre Lokalisation von PKP2 moduliert wird. Die physiologische Bedeutung dieser Modifikation ist nicht weiter aufgeklärt, allerdings wird durch die Autoren ein Zusammenhang zwischen der desmosomalen und der nukleären Lokalisation des Moleküls postuliert.

1.4 Familie der Src-Kinasen

Src-Kinasen stellen die größte Familie der Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen dar und umfassen derzeit neun Mitglieder – Blk, Fyn, Fgr, Hck, Lck, Src, Yes, Yrk und Lyn [Thomas *et al.*, 1997]. Einige dieser Tyrosin-Kinasen werden ubiquitär exprimiert (Src, Fyn und Yes) [Saito *et al.*, 2010], wohingegen andere ein äußerst restringiertes Expressionsmuster zeigen [Quintrell *et al.*, 1987; Dymeckie *et al.*, 1990; Rider *et al.*, 1994]. Alle Src-Kinasen sind gekennzeichnet durch eine konservierte Struktur, die sich aus vier Domänen zusammensetzt [Boggon *et al.*, 2004]. Die Domänen werden als Src-homologe Domänen (SH-Domänen) bezeichnet. Src-Kinasen sind verantwortlich für die Signaltransduktion unterschiedlichster Oberflächenrezeptoren und in dieser Funktion sind sie essentiell für die Regulation dynamischer Prozesse des Zytoskeletts, der Differenzierung, dem Zellzyklus, der Adhäsion und Migration [Abram *et al.*, 2000; Yeatman, 2004]. Die Aktivität der Kinasen wird durch spezifische intramolekulare Phosphorylierungen reguliert und Aberrationen dieses Mechanismus können Auslöser für die Tumorprogression und Metastasen sein [Summy *et al.*, 2003]. Zell- und tumorbiologisch äußert sich derartige Anormalität in einer verstärkten

Proliferationsrate, einer verminderten Adhäsion, einer erhöhten Mobilität und einer Resistenz gegenüber apoptotischen Signalen. In vielen Tumoren ist eine erhöhte Aktivität und / oder Expression einzelner Src-Kinase-Mitglieder festgestellt worden [Bolen *et al.*, 1987; Barraclough *et al.*, 2007; Fizazi, 2007; Posadas *et al.*, 2008]. Ursachen hierfür sind die in einigen Tumoren ebenfalls aberranten Eigenschaften von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen [Pietras *et al.*, 2003; Harari, 2004] oder akzessorischen Molekülen, die ursprünglich die Aktivität der Src-Kinasen regulieren [Weiner *et al.*, 1993; Cam *et al.*, 2001]. Darüber hinaus wurden in einigen Tumoren Genmutationen nachgewiesen, die mit einer erhöhten Kinase-Aktivität einhergehen [Irby *et al.*, 1999]. Zusammenfassend verdeutlichen diese Aspekte die integrale Position der Src-Kinasen bei der Entstehung und dem Fortschritt maligner Erkrankungen.

1.5 Zielstellung

Plakophilin 3 (PKP3) ist ein in nahezu allen Desmosomen-haltigen Geweben vorkommendes Plakophilin und besitzt das breiteste Interaktionsspektrum mit anderen desmosomalen Proteinen. PKP3 wird allerdings, neben seinem Auftreten in Desmosomen, mit anderen zellulären Vorgängen assoziiert, ähnlich wie andere Armadillo-Proteine. Die molekularen Eigenschaften von Armadillo-Proteinen werden in der Regel durch Phosphorylierungen reguliert. An PKP3 sind verschiedene post-translationale Modifikationen beschrieben, jedoch wurde bisher keine näher charakterisiert.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, Proteinmodifikationen von PKP3, die von zell- oder tumorbiologischer Relevanz sein könnten, zu analysieren und deren Auftreten, Vorkommen und funktionellen Einfluss zu identifizieren. Potentielle Phosphorylierungs-Stellen sollten ausgehend von Mutagenese-Konstrukten genauer untersucht werden, um deren Relevanz für die proteinbiochemischen Eigenschaften von PKP3 zu studieren. Die Identifikation zugehöriger Kinasen und die Aufklärung möglicher Signatransduktionswege sollten hierbei einen zentralen Aspekt der Arbeit darstellen. Mit Hilfe Phospho-Tyrosin-spezifischer Antikörper sollten die gefundenen Proteinmodifikationen auf ihre mögliche diagnostische Bedeutung in pathologischem Gewebematerial humaner Tumoren untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Biologische Materialien

2.1.1 Bakterielle Kulturen

Die Genotypen der in der Arbeit verwendeten *Escherichia coli* – Stämme sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Die Bakterien wurden von Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland) oder der DSMZ (Braunschweig, Deutschland) bezogen.

Tabelle 2.1: Genotypische Charakterisierung der *Escherichia coli* – Stämme

Stamm	Genotyp
JM109	e14 ⁻ (McrA ⁻) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(rK-mK ⁺) supE44 relA1 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB+ lacI ^q ZΔM15]
XL-1 Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)]
XL-1 Blue MRF Kan ^R	Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI ^q ZΔM15 Tn5 (Kan ^r)
SOLR	e14 ⁻ (McrA ⁻) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 sbcC recB recJ uvrC umuC::Tn5 (Kan ^r) lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1 λ ^R [F' proAB lacI ^q Z ΔM15] ^C Su ⁻

Zur Kultivierung von *Escherichia coli* wurde LB-Medium verwendet. Festmedien konnten durch die Zugabe von Agar (Endkonzentration 1 %) hergestellt werden. Medien wurden bei 120 °C für 20 Minuten autoklaviert. Je nach Anforderung wurde dem Medium vor Gebrauch das entsprechende Antibiotikum zugesetzt.

pro Liter LB-Medium: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, ad ddH₂O

2.1.2 Eukaryotische Kulturen

Für die Arbeiten standen vier epitheliale Zelllinien zur Verfügung, die in Abhängigkeit von der experimentellen Fragestellung verwendet wurden. Die Zellen wurden von ATCC / LGC Standards (Wesel, Deutschland) bzw. von Frau Dr. Boukamp (HaCaT; DKFZ, Heidelberg) bezogen.

A431-Zellen sind aus einem epithelialen Tumor der Vulva abgeleitet [Giard *et al.*, 1973]. Die Zellen zeigen mikroskopisch ein mehrschichtiges Wachstum und bilden viele desmosomale Kontakte aus [Lewis *et al.*, 1997]. Charakteristisch für diese Zelllinie ist die hohe

Expressionsrate des EGF-Rezeptors, wodurch sie sich sehr gut für Signaltransduktionsanalysen eignet. A431-Zellen wurden in DMEM mit 10 % FKS bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert.

HaCaT-Zellen sind aus der spontanen *in vitro* Transformation einer humanen Hautzelle hervorgegangen [Boukamp *et al.*, 1988]. Da typische Differenzierungsmarker regulär vorkommen, ähneln sie in vielerlei Hinsicht normalen Keratinozyten und sind ein geeignetes Modell zur Untersuchung von Differenzierungsprozessen epithelialer Zellen. HaCaT-Zellen exprimieren von den hier vorgestellten Zellen das meiste PKP3 und werden aus diesem Grund für einen Großteil der Experimente bevorzugt. Sie zeigen in Kultur ein mehrschichtiges Wachstum und werden in DMEM mit 10 % FKS bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank angezüchtet.

CaCo-2-Zellen leiten sich von einem intestinalen Kolonkarzinom ab und differenzieren sich unter Kulturbedingungen zu einem polarisierten einschichtigen Epithel [Fogh, 1975]. Sie exprimieren im Vergleich zu A431- und HaCaT-Zellen weniger PKP3, lassen sich allerdings für bildgebende Fragestellungen besser verwenden. CaCo-2-Zellen werden in EMEM mit 10 % FKS bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert.

PLC-Zellen sind aus einem Hepatozytenkarzinom abgeleitet [Alexander *et al.*, 1976]. Sie exprimieren kein PKP3 und können in diesem Zusammenhang als Negativkontrolle verwendet werden. PLC-Zellen wurden in DMEM mit 10 % FKS bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert

2.2 Vektoren

Um den Einfluss von Tyrosin-Phosphorylierungen auf PKP3 genauer zu studieren, sollten ausgewählte Tyrosine substituiert werden. Für diese Arbeiten wurden zwei verschiedene Plasmide verwendet, die im Folgenden näher erläutert sind. Alle abgebildeten Plasmide sind nicht maßstabsgetreu dargestellt.

Der Vektor pBluescript R3-NPP3 diente als Mutagenese- und Klonierungsvektor und kodiert ausschließlich für den PKP3 N-Terminus (vgl. Abb. 2.1). Da alle untersuchten Tyrosine in diesem Sequenzbereich vor den *armadillo-repeats* lagen, konnte auf dieses bereits vorhandene Vektorkonstrukt zurückgegriffen werden. Bluescript-Vektoren sind Hybridkonstrukte aus den genetischen Informationen von Phagen und bakteriellen Plasmiden, die als Phagemide bezeichnet werden. Die genetischen Besonderheiten der Phagemide werden für die weiteren Betrachtungen vernachlässigt.

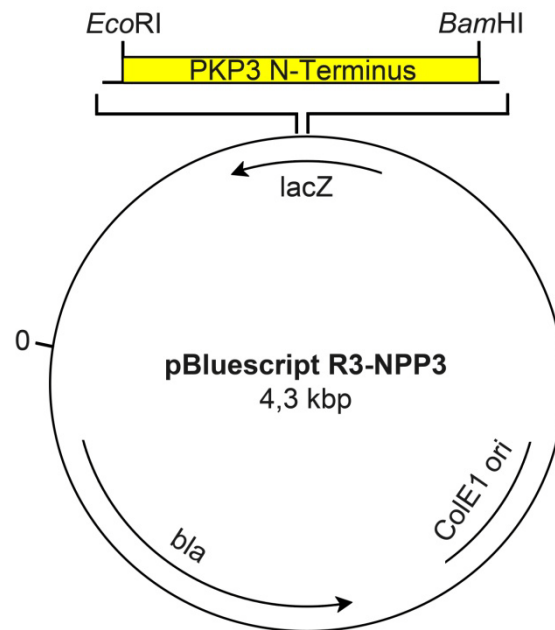


Abbildung 2.1: pBluescript R3-NPP3 (4,3 kbp).

Der Vektor kodiert für den PKP3 N-Terminus, welcher über *EcoRI* und *BamHI* aus der kompletten cDNA von PKP3 kloniert wurde. Als Selektionsmarker für die Transformation dient das Gen zur Expression der β -Laktamase (*bla*), das eine Ampicillin-Resistenz vermittelt. Alle Zahlen sind in Nukleotidpositionen angegeben.

Als Selektionsmarker besitzt dieser Vektor das β -Laktamase-Gen, welches eine Resistenz gegenüber Ampicillin vermittelt. Der ColE1-ori ist für die hohe Replikationsrate des Konstruktes in Bakterien verantwortlich. Für die eigenen Experimente wurde der Vektor für Mutagenesen verwendet, um gezielte Aminosäure-Substitutionen zu erzeugen. Darüber hinaus konnten bereits bestehende Einzelmutationen zu einer Kombinationsmutante vereinigt werden, die alle erzeugten Mutationen umfasste.

Ausgehend vom Vektor pBluescript R3-NPP3 wurden die erzeugten Mutationen in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA6 PKP3-CKT3 kloniert. Dieses Expressionsplasmid kodiert für das gesamte Protein und stammt auch aus früheren Arbeiten. Die cDNA des menschlichen PKP3 wurde über *EcoRI* ungerichtet in pcDNA6 kloniert. Am C-Terminus ist PKP3 zusätzlich mit einem KT3-Tag (KPPTPPPEPET) fusioniert, welcher eine spezifische Detektion des Expressionskonstruktes ermöglicht (A. Schmidt persönliche Mitteilung). Der Vektor hat eine Größe von 6,6 kbp und ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

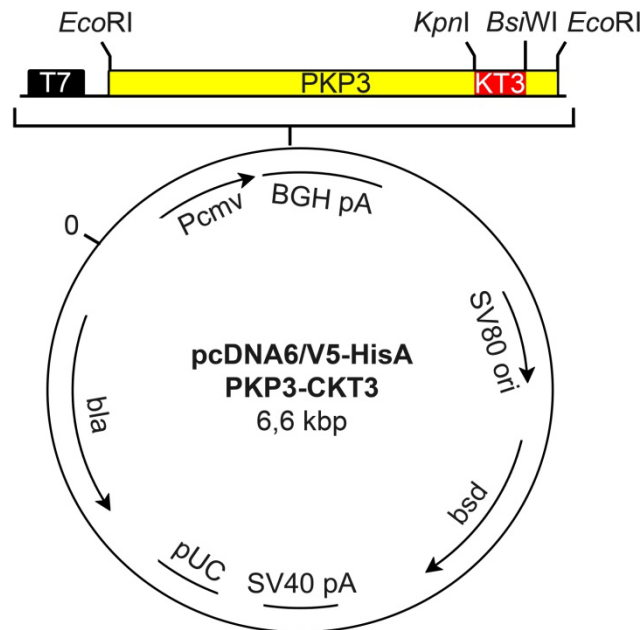


Abbildung 2.2: pcDNA6 PKP3-CKT3 (6,6 kbp).

Das Plasmid beinhaltet die gesamte PKP3-cDNA. Die Promotoren P_{cmv} und SV40 kontrollieren die Proteinexpression in eukaryotischen Zellen. Die Terminationsstrukturen des Rinderwachstums-Hormons (BGH pA) und des SV40 pA führen zur effizienten Termination und Polyadenylierung der erzeugten mRNA. Die Gene für die β -Laktamase (bla) und Blasticidin (bsd) dienen als Selektionsmarker.

Die bakterielle Replikation des Plasmids wird durch den „high-copy“ ori pUC sichergestellt und als bakterielle Selektionsmarker können sowohl Ampicillin wie auch Blasticidin verwendet werden. Die eukaryotische Expression von PKP3 wird durch den Promotor des humanen Zytomegalie-Virus (P_{cmv}) kontrolliert, der eine effiziente Expression des rekombinanten Proteins in eukaryotischen Zellen ermöglicht. Für die Selektion stabiler eukaryotischer Zelllinien wird die Resistenz gegenüber Blasticidin genutzt, wobei die Expression des Blasticidin-Gens (bsd) durch den SV40 Promotor reguliert wird.

Für die Expression von rekombinantem PKP3 wurde der Vektor pQE30 von Qiagen (Hilden) verwendet. Über einen Polylinker (MCS) können die DNA-Abschnitte gezielt in den Expressionsvektor kloniert werden. Die Expression des Proteins wird durch den T5-Promotor gesteuert und durch den *lac*-Operator reguliert bzw. induziert. Zur Aufreinigung oder Detektion des Proteins kann der Penta-His-Tag genutzt werden. Transformanten können über das Ampicillin-Resistenzgen selektiert werden. In Abbildung 2.3 ist der Vektor pQE30 dargestellt.

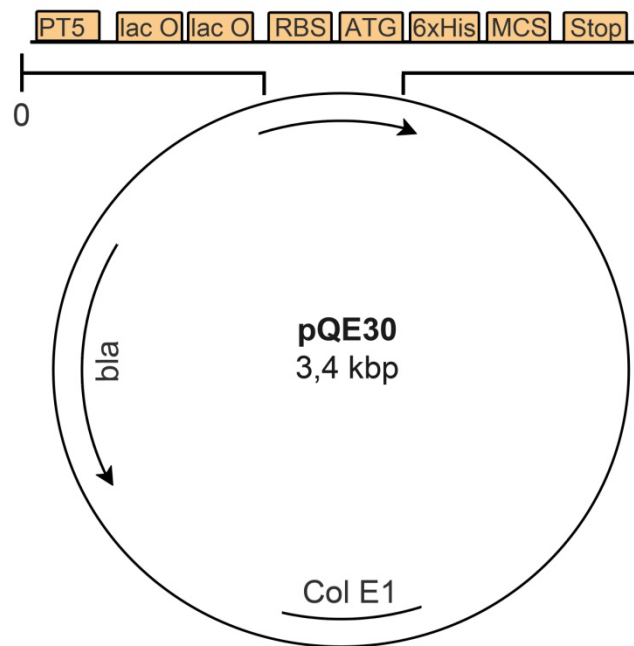


Abbildung 2.3: pQE30 (3,4 kbp).

Das bakterielle Expressions-Plasmid ermöglicht eine durch den *lac*-Operator (*lac O*) regulierte Genexpression. Diese wird gesteuert durch den T5-Promotor. Nach Bindung der Ribosomen (RBS) wird der Polyhistidin-Tag (6xHis) mit dem im Polylinker (MCS) kodierten DNA-Konstrukt transkribiert. Die Transkription endet an definierten Stop-Codons.

2.3 Enzyme

Tabelle 2.2: Restriktionsendonukleasen

Enzyme	Erkennungssequenz	Hersteller
<i>Bam</i> HI	5'...G↓GATCC...3' 3'...CCTAG↑G...5'	Fermentas
<i>Bgl</i> II	5'...A↓GATCT...3' 3'...TCTAG↑A...5'	Fermentas
<i>Bmg</i> BI	5'...CAC↓GTC...3' 3'...GTG↑CAG...5'	New England Biolabs
<i>Bsi</i> WI	5'...C↓GTACG...3' 3'...GCATG↑C...5'	New England Biolabs
<i>Bsp</i> EI	5'...T↓CCGGA...3' 3'...AGG↑CCT...5'	Fermentas
<i>Eco</i> RI	5'...G↓AATTC...3' 3'...CTT↑AAG...5'	Fermentas
<i>Sbf</i> I	5'...CCTGC↓AGG...3' 3'...GG↑ACGTCC...5'	New England Biolabs
<i>Sma</i> I	5'...CCC↓GGG...3' 3'...GGG↑CCC...5'	Roche

Tabelle 2.3: Ligasen

Ligase	Hersteller
T4-DNA-Ligase	Fermentas

Tabelle 2.4: Peptidasen

Peptidase	Hersteller
Trypsin	Becton Dickinson

Tabelle 2.5: Phosphatasen

Phosphatase	Hersteller
Alkalische Phosphatase (CIP)	New England Biolabs

2.4 Wachstumsfaktoren und Inhibitoren

Tabelle 2.6: Wachstumsfaktoren

Aktivator	Hersteller
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	Biomol
Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 1 (IGF-1)	Biomol
Hepatozyten Wachstumsfaktor (HGF)	Biomol

Tabelle 2.7: Inhibitoren

Inhibitor	Hersteller
4-Amino-5-(4-methylphenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine – PP1	<i>Biaffin</i>
4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4,d]pyrimidine – PP2	Biaffin
2,3-Dihydro-N,N-dimethyl-2-oxo-3-[(4,5,6,7-tetrahydro-1H-indol-2-yl)methylene]-1H-indole-5-sulfonamide – SU6656	Biaffin
4-(3'-Methoxy-6'-chloro-anilino)-6-Methoxy-7-(Morpholino-3-propoxy)-quinazoline – Src No.5	Biaffin

2.5 Kommerzielle Komplettsysteme

Tabelle 2.8: Komplettsysteme

Bezeichnung	Hersteller	Verwendung
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen	Plasmidpräparation
MonsterScript 1st-Strand cDNA Synthesis Kit	Biozym	cDNA-Synthese
pGEM®-T Easy Vector System II	Promega	TA-Klonierung
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes	PCR
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen	Gelextraktion von DNA
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen	Aufreinigung von DNA
QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene	Mutagenese
ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kit	Bio-Rad	2D-Gelelektrophorese
RNeasy Mini Kit	Qiagen	RNA-Isolierung
SulfoLink Immobilization Kit for Peptides	Pierce	Antikörper-Aufreinigung

2.6 Chemikalien und Substanzen

Tabelle 2.9: Chemikalien und Substanzen

Reagenz	Hersteller
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich
3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propansulfonat (CHAPS)	Sigma-Aldrich
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich
5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP)	Roth
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal)	Roth
Aceton	Acros

Reagenz	Hersteller
Acrylamid Rotiphorese Gel 30	Roth
Adenosintriphosphat	Fermentas
Agar	BD
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Ampicillin	USB
β -Mercaptoethanol	Merck
Blasticidin S	Invitrogen
Borsäure	Fisher
Bromphenolblau	Serva
DeStreak	Amersham Biosciences
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dynabeads Protein G	Invitrogen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Diagnostic
Ethanol	Mallinckrodt Baker
Ethidiumbromid	Merck
Fluoromount G	Southern Biotechnology
Fötales Kälberserum (FKS)	Invitrogen
Freund-Adjuvans (inklomplett)	Sigma-Aldrich
Freund-Adjuvans (komplett)	Sigma-Aldrich
Gelatine	Sigma-Aldrich
Glycerol	Merck
Glycin	Roth
Harnstoff	Invitrogen
Hefeextrakt	BD
Iodacetamid	Sigma-Aldrich
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Baker Analyzed Reagent
LE-Agarose	Cambrex Bioscience

Reagenz	Hersteller
Magermilch	Merck
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Baker Analyzed Reagent
Magnesiumsulfat	Fluka
Manganchlorid (MnCl_2)	Merck
Methanol	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumcitrat	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Natrium-Orthovanadate	New England Biolabs
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Roth
Nonidet P-40 (NP-40)	US Biological
Pepstatin	Sigma-Aldrich
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich
Ponceau S	Fluka
Rinderalbumin Fraktion V (BSA)	Roth
Salzsäure (HCl)	Merck
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Bio-Rad
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth
Thioharnstoff	Roth
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth
Triton X-100	Serva
Trypton	BD
Tween 20	Serva
Wasserstoff-Peroxid (H_2O_2)	Merck
Xylencyanol	Merck

2.7 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von Biomers (Ulm) bezogen.

Tabelle 2.10: verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' – 3')	Verwendung
PP3 S196A fw	CCT GGA CGA CCG CTA CGC CCT GGT GTC TGA GCA G	Mutagenese
PP3 S196A rev	CTG CTC AGA CAC CAG GGC GTA GCG GTC GTC CAG G	Mutagenese
PP3 Y195F fw	GGG CCT GGA CGA CCG CTT CGC CCT GGT GTC TGA G	Mutagenese
PP3 Y195F rev	CTC AGA CAC CAG GGC GAA GCG BGTC GTC CAG GCC C	Mutagenese
pkp3 y205f sense	GCG GCC ACC TCC ACC TTC AGG GCC TTT GCG TAC G	Mutagenese
pkp3 y205f antisense	CGT ACG CAA AGG CCC TGA AGG TGG AGG TGG CCG C	Mutagenese
T3	ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA	Sequenzierung
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	Sequenzierung
SP6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG	Sequenzierung

2.8 Antikörper

2.7.1 Primärantikörper

Tabelle 2.11: verwendete Primärantikörper und eingesetzte Verdünnungen

Name	Spezies	WB	IF	IHC	Hersteller
α -PKP3 p-Y195	Kaninchen, polyklonal	1:100	1:10	1:5	eigene Herstellung
α -PKP3 270.6.2	Maus IgG	1:500	1:50		Progen
α -PKP3 310.9.1	Maus IgG	1:1000	1:100	1:50	Progen
α -PKP3 23E3/4	Maus IgG	1:2000			Invitrogen
α -PKP3 P3-3 Rab	Kaninchen, polyklonal	1:4000	1:2000		eigene Herstellung

Name	Spezies	WB	IF	IHC	Hersteller
α -Phospho-ERK1/2 (Klon E4)	Maus IgG	1:1000			Santa Cruz
α -KT3	Maus IgG	1:1000	1:500		Eurogenetec Sigma
α - β -Aktin	Maus IgG	1:80000			
α -c-Src (17AT28)	Maus IgG		1:100		Abgent
α -c-Src (32G6)	Kaninchen IgG	1:1000			Cell Signaling
α -Phospho-Y20	Maus IgG	1:1000			Zymed
α -P-Tyr-100	Maus IgG	1:2000			Cell Signaling

2.7.2 Sekundärantikörper

Tabelle 2.12: verwendete Sekundärantikörper und eingesetzte Verdünnungen

Name	Spezies	WB	IF	IHC	Hersteller
α -Maus HRP	Kaninchen, polyklonal	1:1500			DAKO
α -Maus AP	Kaninchen, polyklonal	1:500			DAKO
α -Kaninchen HRP	Schwein, polyklonal	1:1700			DAKO
α -Kaninchen AP	Ziege, polyklonal	1:500			DAKO
α -Maus Cy2	Ziege IgG		1:400		Dianova
α -Kaninchen Cy3	Esel IgG		1:1000		Dianova

2.9 Geräte und Hilfsmittel

Tabelle 2.13: verwendete Geräte und Hilfsmittel

Gerätebezeichnung	Hersteller
Acrylamid-Gelelektrophoresekammer	GE Healthcare
Agarose-Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad
Aufsichtmikroskop Axiovert 135TV	Zeiss
Färbeautomat Autostainer Plus	Dako
Axiophot-2 Fluoreszenzmikroskop	Zeiss

Gerätebezeichnung	Hersteller
Biofuge fresco	Heraeus
Biofuge pico	Heraeus
Brutschrank 37 °C und 5 % CO ₂	Binder
Cell Disruptor B15	Branson Sonifier
Drehrad MACSmix	Miltenyi Biotec
Digitalkamera DFC320	Leica Microsystems
Durchlichtmikroskop CH-2	Olympus
Durchlichtmikroskop DRMB	Leica Microsystems
Entwicklungsmaschine Curix 60	Agfa
Geldokumentation E.A.S.Y. Win32	Herolab GmbH
Kern GJ Laborwaage	Kern&Sohn GmbH
Magnetic Particle Concentrator	Dynal Biotech
Magnetrührer	IKA Labortechnik
Mikrobiologischer Brutschrank 37 °C	Heraeus
Multiporator	Eppendorf
Nass-Blotkammer TE22	Hoefer
pH-Meter	Schott AG
Spektrophotometer Gene Quant Pro	GE Healthcare
Sterilbank – Holton Lamin Air	Integra Biosciences
Stromversorgungsgeräte PowerPac	Bio-Rad
UV-Tisch Fisherlab	Herolab GmbH
Zentrifuge Jouan KR22	Jouan

2.10 Tierexperimentelle Methoden

2.10.1 Immunisierung der Kaninchen

Zur Herstellung von Antikörpern können Tiere mit hochgereinigtem Antigen immunisiert werden. Jedoch ist zu beachten, dass niedermolekulare Antigene, wie beispielsweise Peptide, immunologisch wenig oder nicht reaktiv sind („Hapten“). Um für diese Antigene dennoch eine immunologische Antwort zu generieren, werden diese an ein Trägerprotein („Carrier“) gekoppelt. Immunologisch wird von einem Hapten-Carrier-Komplex gesprochen. Eines der am häufigsten verwendeten Trägerproteine ist das Hämazytin der Großen Kalifornischen Schlüssellochnapfschnecke (KLH). Dieser hochmolekulare Proteinkomplex verursacht eine starke humorale und zelluläre Immunantwort.

Für die initiale Immunisierung wurden 250 µl komplettes Freundesches Adjuvans mit 125 µg KLH-gekoppeltem Peptid (in 250 µl PBS) vermengt. Der Ansatz wurde gemischt, bis eine milchige, zäh-flüssige Suspension entstand. Das Homogenisat wurde Kaninchen subkutan an beiden Flanken injiziert. Für jedes Peptid wurden parallel zwei Kaninchen geführt. Im Abstand von jeweils drei Wochen wurden Auffrischungs-Immunisierungen injiziert. Für diese wurden 125 µg Antigen (in 250 µl PBS) mit 250 µl nicht-komplettem Freundeschen Adjuvans homogenisiert. Bis zu 5 Auffrischungs-Immunisierungen wurden durchgeführt und regelmäßig Testblut aus der Ohrvene entnommen. Durch Analyse des Testblutes wurde die Immunantwort permanent kontrolliert und der Zeitpunkt für die finale Blutabnahme festgelegt. Für die Gewinnung der Antiseren wurde das Blut nach Methode 2.10.2 weiterbehandelt.

PBS: 8,1 mM Na₂HPO₄ pH 7,2; 1,5 mM KH₂PO₄; 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl

2.10.2 Gewinnung von Antiserum

Das entnommene Blut wurde für 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend bei 3.000 U/min für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das Serum wurde in 2 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und mit 0,1 % Natriumazid versetzt. Die Aliquots wurden bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.11 Methoden der Zellkultur

2.11.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Für die Arbeiten wurden verschiedene adhärent wachsende Zelllinien in 6 cm Petrischalen kultiviert (siehe Abschn. 2.1.2). Die Zellen wurden mikroskopisch beobachtet, um das Wachstum zu überprüfen und die Gefahr von Kontaminationen auszuschließen. Bei einer Konfluenz von 95 bis 100 %, was einem Teilungssynchronismus von drei bis vier Tagen entsprach, wurden die Zellen geteilt und in neue Zellkulturschalen überführt. Zu diesem Zweck wurden der Zellrasen mit EDTA-haltigem PBS gewaschen und bei 37 °C mit Trypsin-haltigem PBS von der Petrischale abgelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension mit FKS-haltigem Medium versetzt und entsprechend dem Teilungsverhältnis auf neuen Petrischalen ausgesät.

PBS / EDTA: 1x PBS pH 7,2; 7 mM EDTA

PBS / Trypsin: 1x PBS pH 7,2; 0,25 % Trypsin

2.11.2 Behandlungen an eukaryotischen Zellen

Die eukaryotischen Zellen mussten für einige Versuche mit verschiedenen Substanzen behandelt werden. Zu diesem Zweck wurden die Zellen etwa 72 Stunden vor der Behandlung ausgesät und bis zu einer Konfluenz von circa 70 % kultiviert. Für zeit- und konzentrationsabhängige Versuche mit großem Probenumfang wurden die Zellen ausgehend von einer Zellkulturschale kontinuierlich expandiert, um eine gewisse Homogenität innerhalb der Zellkultur zu gewährleisten. Bei Erreichen der Zelldichte wurde der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden anschließend für 24 Stunden mit Serum-freiem Medium kultiviert („Starvation“). Für die Behandlung wurde die entsprechende Substanz schließlich direkt in das Serum-freie Medium gegeben. Behandlungszeiten und eingesetzte Konzentrationen sind in den Experimenten jeweils angegeben.

2.11.3 Pervanadat-Präparation und –Behandlung eukaryotischer Zellen

Für die irreversible Inaktivierung zellulärer Tyrosin-Phosphatasen wurden die eukaryotischen Zellen mit dem Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor Pervanadat behandelt. Diese Substanz wurde nach einem Protokoll von Huyer *et al.* aus Natrium-Orthovanadat hergestellt [Huyer *et al.*, 1997]. Hierfür wurde 30-%ige Wasserstoffperoxid-Lösung mit HEPES-Puffer auf 0,3 % verdünnt. Für die Präparation einer 1 mM Pervanadat-Lösung wurden 50 µl des verdünnten Wasserstoffperoxids mit 10 µl 100 mM Natrium-Orthovanadat versetzt und mit 940 µl Aqua

dest. gemischt. Nach fünfminütiger Inkubationszeit wurde das überschüssige Wasserstoffperoxid durch Zugabe einer Pipettenspitze Katalase abgebaut. Diese Lösung konnte direkt ins Serum-haltige Medium gegeben werden. Die eingesetzten Konzentrationen sind für die jeweiligen Experimente aufgeführt.

HEPES: 20 mM HEPES, pH 7,2

2.11.4 Transfektion eukaryotischer Zellen

Als Transfektion wird das Einbringen von Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen bezeichnet. In der Regel werden diese nicht wie bei der bakteriellen Transformation „nackt“ in die Zelle gebracht, sondern in Form von Polymerkomplexen oder in Liposomen verpackt. Bei dem verwendeten Transfektionsreagenz jetPEI handelt es sich um ein kationisches Polymer, welches mit der DNA stabile, positiv geladene Komplexe bildet. Diese Komplexe können durch Endozytose von den eukaryotischen Zellen aufgenommen werden.

Für die Transfektion wurden die Zellen in einem Teilungsverhältnis ausgesät, mit welchem nach 24 Stunden eine Konfluenz von circa 50 % erreicht wurde. Für eine 6 cm Petrischale wurden gemäß den Angaben des Herstellers 5 µg DNA mit 10 µl jetPEI in je 250 µl von 150 mM NaCl vermennt, gemischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde diese Lösung in das Serum-haltige Medium pipettiert und die Zellen für 48 Stunden kultiviert.

Nach 48 Stunden sind die Zellen mikroskopisch 100 % konfluent und wurden auf drei 10 cm Petrischalen geteilt. Durch Zugabe des Antibiotikums Blastidin S konnte ein Selektionsdruck auf die Zellen ausgeübt werden, wodurch in den folgenden Tagen nahezu alle Zellen apoptotisch wurden. Blastidin S ist eine Substanz, die von *Streptomyces griseochromogenes* produziert wird und die eukaryotische Translation inhibiert. Die wenigen überlebenden Zellen entwickelten sich im Verlauf mehrerer Wochen zu einzelnen Kolonien und wurden bei entsprechender Koloniegröße mit einem Trypsin-getränkten Papierplättchen auf 24-Well-Platten vereinzelt. Diese Einzelkolonien wurden auf die Expression des transfizierten Konstruktes per Immunfluoreszenz und Immunoblotting analysiert. Stabile, positiv transfizierte Zellen wurden möglichst frühzeitig expandiert und in Serum-freiem Medium mit 10 % DMSO bei -196 °C eingefroren.

2.11.5 Methanol / Aceton-Fixierung von Zellen

Zelluläre Strukturen können durch die spezifische Lokalisation von Proteinen mikroskopisch sichtbar gemacht werden. Deren Integrität kann jedoch nur sichergestellt werden, wenn die Kulturzellen vor der Detektion fixiert wurden. Hierbei können durch Auswahl eines bestimmten Fixativs unterschiedliche Fixiereigenschaften erreicht werden, die entscheidenden Einfluss auf die nachfolgenden Analysen haben können. Die Formaldehyd-Fixierung beispielsweise kreuzvernetzt die Proteine, wodurch unter Umständen Antikörper-Epitope modifiziert werden und der weitere Nachweis behindert wird. Im Gegensatz dazu werden bei der Methanol / Aceton-Fixierung die Proteine lediglich auf der Zellträgermatrix präzipitiert, was jedoch zum Verlust der leicht löslichen Proteine führen kann. Vor- und Nachteile der jeweiligen Fixierungsmethode müssen für jede experimentelle Fragestellung genau abgewogen werden.

Als Standardmethode für die vorliegende Arbeit wurde die Methanol / Aceton-Fixierung gewählt, weil sie einen guten Kompromiss zwischen Antigenerhalt und Detektionslimit darstellte. Hierfür wurden vor dem Aussäen der Kulturzellen einige Deckgläschen in der Petrischale platziert. Nach Erreichen der gewünschten Konfluenz wurden die Deckgläschen in Magnesium-Chlorid-haltigem PBS gewaschen und für 5 Minuten in -20 °C kaltes Methanol gestellt. Anschließend wurden sie in -20 °C kaltes Aceton überführt und für 1 Minute inkubiert. Die luftgetrockneten Deckgläschen wurden bei -20 °C gelagert.

MgCl₂-PBS: PBS, pH 7,2; 2 mM MgCl₂

2.12 Molekularbiologische Methoden mit Nukleinsäuren

2.12.1 RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen

Mit dieser Methode kann die gesamte RNA aus eukaryotischen Zellen gewonnen werden. Hierfür wurde der RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet und entsprechend den Angaben des Herstellers eingesetzt.

2.12.2 cDNA-Synthese

Die reverse Transkription gestattet die Herstellung eines komplementären DNA-Stranges (cDNA) aus mRNA. Katalysiert wird diese Reaktion durch eine reverse Transkriptase viralen Ursprungs. Diese ist mit Hilfe spezifischer Primer in der Lage, an die RNA-Matrize eine einzelsträngige DNA zu synthetisieren.

Für die Reverse Transkription (cDNA-Synthese) wurde das MonsterScript 1st-Strand cDNA Synthesis Kit von Biozym verwendet und in einer 20 µl Reaktion wurden folgende Komponenten eingesetzt:

4 µl	5x cDNA PreMix
2 µl	Random-Primer (Nonamer)
1 µl	MonsterScript Reverse Transkriptase
1 µg	RNA
auffüllen mit Aqua dest.	

Abweichend von den Angaben des Herstellers wurde die initiale Denaturierung der RNA für fünf Minuten bei 85 °C durchgeführt. Alle weiteren Arbeitsschritte entsprechen dem Protokoll. Mit spezifischen Oligonukleotiden konnten aus dem hergestellten cDNA-Pool relevante DNA-Abschnitte per PCR amplifiziert und für weitere Klonierungen verwendet werden.

2.12.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR gestattet eine gezielte Amplifikation von DNA-Abschnitten. Voraussetzung dafür ist das Vorhandensein bekannter Teilsequenzen, anhand welcher spezifische Oligonukleotide, sog. Primer, definiert werden können. Ausgehend von diesen Primern wird die DNA-Synthese gestartet und durch eine zyklische Abfolge von Denaturierungs-, Annealing- und Elongationsschritten die exponentielle Vermehrung des gewünschten DNA-Abschnitts ermöglicht.

Für die PCR wurde die Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase von Finnzymes verwendet. Hierbei handelt es sich um einen kompletten MasterMix, der ausschließlich mit der Matrizen-DNA und den entsprechenden Oligonukleotiden vervollständigt werden muss. Der Reaktionsansatz und die jeweiligen Reaktionsbedingungen richten sich nach den Angaben des Herstellers.

Die Reaktionsprodukte wurden im Agarosegel mit 8 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auswertung der Gele erfolgte durch Färbung mit Ethidiumbromid und unter UV-Licht. Für die Größenabschätzung der DNA wurde ein 1 kb Größenstandard von Invitrogen verwendet. Die PCR-Fragmente wurden mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen) aufgereinigt und anschließend sequenziert oder für die TA-Klonierung vorbereitet.

2.12.4 in vitro orts-spezifische Mutagenese

Mit Hilfe der orts-spezifischen Mutagenese kann die DNA an gezielten Positionen verändert werden. Das Prinzip der Mutagenese liegt in der Verwendung mutierter Oligonukleotide, die zusätzlich zu komplementären, auch mutierte Abschnitte besitzen und somit die Insertion und / oder Deletion von Nukleotiden gestatten. Das verwendete Mutagenese-System von Stratagene ermöglichte die Substitution einzelner oder mehrerer Nukleotide, um gezielte Aminosäureänderungen auf Proteinebene zu erzeugen. Die Primer wurden für die Mutagenese-PCR so konstruiert, dass diese 5' und 3' der Mutationsstelle komplementär waren, wodurch jedes neu synthetisierte DNA-Fragment die gewünschte Mutation besaß. Um das unmutierte Ausgangs-Plasmid aus der Mutagenese-Reaktion zu entfernen, wurde das Enzym *DpnI* verwendet. *DpnI* ist ein Methylierungs-sensitives Restriktionsenzym und spaltet spezifisch das methylierte Ausgangskonstrukt. Alle Schritte der Mutagenese-Reaktion wurden entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Erfolg der Mutagenese wurde durch Minipräparation von Plasmid-DNA und nachfolgende Sequenzierung sichergestellt.

2.12.5 TA-Klonierung

Prinzipiell können PCR-Fragmente mittels Verdau durch Restriktionsenzyme in Vektoren kloniert werden. Hierfür werden die Oligonukleotide normalerweise um Sequenzinformationen erweitert, die Restriktionsschnittstellen enthalten. Demzufolge kann nach erfolgter PCR das DNA-Fragment mit den entsprechenden Enzymen verdaut und schließlich kloniert werden. Diese Methodik gelangt mit größeren PCR-Fragmenten schnell an ihre Grenzen und führt zu sehr geringen Ausbeuten. Eine alternative Klonierungsstrategie stellt die TA-Klonierung dar. Hierbei wird der amplifizierte DNA-Abschnitt durch die Taq-

Polymerase an den 3'-Enden unspezifisch um ein Adenosin verlängert und kann direkt in einen mit einem 5'-Überhang geöffneten Vektor ligiert werden. Diese TA-Klonierungsvektoren ermöglichen durch eine Vielzahl verschiedener Restriktionsstellen weitere Klonierungen.

Die PCR-Fragmente wurden im ersten Schritt um ein Adenosin verlängert, wofür folgende Reaktion angesetzt wurde:

10 µl	PCR-Fragment
3 µl	10x Taq-Polymerase-Puffer
3 µl	2 mM dATP
3 µl	Taq-Polymerase (1 U/µl)
auf 30 µl mit Aqua dest. auffüllen.	

Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei 72 °C inkubiert und anschließend mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt. Die Ligation mit dem TA-Klonierungsvektor wurde mit Hilfe des pGEM-T Easy Kit durchgeführt und richtete sich nach den Angaben des Herstellers (Promega). Der Erfolg der Insertion konnte durch Blau / Weiß-Selektion von *Escherichia coli* JM109-Zellen sichergestellt werden.

2.12.6 Restriktion von DNA

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, die dsDNA sequenzspezifisch spalten. Die Restriktion von DNA diente sowohl für analytische als auch für präparative Zwecke. In Tabelle 2.14 sind beide Restriktionsansätze zusammengefasst.

Tabelle 2.14: Restriktionsansätze für einen analytischen oder präparativen Verdau.

Komponente	Analytischer Verdau (20 µl)	Präparativer Verdau (50 µl)
DNA	0,5 µg	10 µg
10x Puffer	2 µl	5 µl
Enzym	10 U	20 U
Aqua dest.	auf 20 µl	auf 50 µl

Die Inkubationsbedingungen sowie die verwendeten Puffer richteten sich nach den Angaben des Herstellers. Nach mindestens einstündiger Inkubation erfolgte die Analyse mittels Agarose-Gelelektrophorese. Präparative Restriktionen wurden ausschließlich für Klonierungen durchgeführt, wobei die DNA-Fragmente über ein präparatives Agarosegel gezielt isoliert und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) extrahiert wurden.

2.12.7 Ligation

Ligasen sind Enzyme, die *in vitro* die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einem 5'-Phosphat- und einem 3'-Hydroxylende katalysieren. Durch Ligation können somit die kohäsiven Enden eines Vektor- und Insertfragments verknüpft werden.

Die Ligation wurde in zwei Schritte durchgeführt und ist in Tabelle 2.15 aufgeführt.

Tabelle 2.15: Ligationsansatz

Komponente	Ligationsansatz (20 µl)
Vektor	50 ng
Insert	100 ng
Aqua dest.	auf 17 µl
	5 min 45 °C → Eis
10x Ligationspuffer	2 µl
T4-DNA-Ligase	1 U

Der fünfminütige Inkubationsschritt bei 45 °C diene der Auflösung von unspezifischen Basenpaarungen im Vektor- sowie Insertfragment. Die Ligation erfolgte bei 16 °C über Nacht. Nach Inaktivierung der Ligase bei 65 °C wurde der Ligationsansatz mit dem zehnfachen Volumen Butanol gefällt und in Aqua dest. resuspendiert. Schließlich wurden elektrokompetente *Escherichia coli* XL1-Blue-Zellen mit dem Ligationsprodukt transformiert.

2.12.8 Minipräparation von Plasmid-DNA

Mit dieser Methode wird Plasmid-DNA aus Bakterien präpariert, um die nach der Transformation kultivierten Bakterienkolonien auf positive Klone zu selektieren. Hierfür wird nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mit nachfolgender Neutralisation Plasmid-DNA von chromosomaler DNA und zellulären Proteinen getrennt [Birnboim *et al.*, 1979].

Für die Minipräparation wurden 3 ml selektives LB-Medium mit einer Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C im Horizontalschüttler inkubiert. 2 ml dieser Vorkultur wurden bei 5.000 U/min zentrifugiert und das Pellet in 100 µl P1 mit 100 µg/ml RNase A resuspendiert. Die alkalische Lyse erfolgte durch Zugabe von 200 µl P2 und wurde durch 150 µl Neutralisationspuffer P3 gestoppt. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden die chromosomale DNA und die Proteinbestandteile für 15 Minuten bei 13.000 U/min und 4 °C abzentrifugiert und die Plasmid-DNA mit eiskaltem 100 % Ethanol gefällt. Die Probe wurde

fünf Minuten in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei 13.000 U/min und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und in 50 µl TE-Puffer resuspendiert.

P1: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA

P2: 200 mM NaOH; 1 % SDS

P3: 3 M Kaliumacetat, pH 5,5

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,1 mM EDTA

2.12.9 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Die Maxipräparation dient der Gewinnung von Plasmid-DNA aus bakteriellen Zellen. Hierfür werden in der Regel die bei der Minipräparation positiv selektierten Klone ausgewählt, um Plasmid-DNA in größerem Maßstab zu isolieren.

Maxipräparationen wurden ausschließlich für das eukaryotische Expressionsplasmid pcDNA6/V5 durchgeführt, wobei die Entfernung des bakteriellen Endotoxins im Vordergrund stand. Zu diesem Zweck wurde das Endofree Maxi Kit von Qiagen verwendet, welches durch Einsatz von speziellen Reagenzien Endotoxin-freie Plasmid-DNA isoliert.

Eine 100 ml Hauptkultur mit selektivem LB-Medium wurde mit 100 µl Vorkultur aus der Minipräparation beimpft und über Nacht bei 37 °C auf dem Horizontalschüttler kultiviert. Der Zellaufschluss und die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgten nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mit anschließender Bindung an einen Ionenaustauscher nach den Angaben des Herstellers. Das Pellet wurde in TE-Puffer resuspendiert und die DNA-Konzentration auf 1 µg/µl eingestellt.

2.13 Molekularbiologische Arbeiten mit Proteinen

2.13.1 Affinitätsaufreinigung von polyklonalen Antisera an Peptid-gekoppelten Säulen

Polyklonale Antisera sind eine Mischung aus verschiedenen Antikörpermolekülen, die von unterschiedlichen Antikörper-bildenden Immunzellen gebildet werden. Neben Antikörpern mit hoher Antigenspezifität existieren immer Kreuzreaktionen mit anderen Antigenen. Hierbei gilt es zwischen strukturell ähnlichen Antigenen und unspezifischen Kreuzreaktionen mit weniger verwandten Strukturen zu unterscheiden. Die Aufreinigung des polyklonalen Rohserums kann durch Affinitätschromatographie am spezifischen Antigen erfolgen und gestattet eine Verbesserung der spezifischen Reaktion vor dem Hintergrund unerwünschter Kreuzreaktionen, sowie eine Konzentrierung des polyklonalen Antikörpers.

Für die Aufreinigung der polyklonalen Rohseren wurde das SulfoLink Immobilization Kit for Peptides verwendet. Mit diesem System konnte ein Peptid kovalent an das Säulenmaterial über eine Thioetherbindung gekoppelt werden. Zu diesem Zweck musste bei der Synthese der eingesetzten Peptide (siehe Tab. 3.4) ein N-terminales Cystein angefügt werden. Diese Aminosäure besitzt eine Sulfhydryl-Gruppe, über welche die Thioetherbindung an das Säulenmaterial vermittelt wurde. Die Präparation der Säule richtete sich nach den Angaben des Herstellers. Für die Affinitätsaufreinigung wurden immer frische Rohseren aufgetaut und für 15 Minuten bei 13.000 U/min zentrifugiert. 1 ml des Überstandes wurde verwendet und gemäß den Angaben aufgereinigt. Für die Elution wurden dreimal 2 ml Elutionspuffer über die Säule gegeben, wobei die erste Elution verworfen wurde. Abschließend wurde 1 ml Elutionspuffer zugegeben und die Säule ein letztes Mal eluiert. Die Eluate wurden vereinigt und mit Natriumazid und BSA (beide 0,05 % Endkonzentration) versetzt. Nach Antikörperkontrolle wurde die Probe aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

2.13.2 Gesamtproteinextraktion

Bei der Gesamtproteinextraktion werden Kulturzellen, mit dem Ziel den physiologischen und aktuellen Zustand der Zellen festzuhalten und jegliche weitere Proteinmodifikation durch zelluläre Enzyme zu unterbinden, direkt aufgeschlossen. Für diese Extraktionsmethode eignet sich der Laemmli-Lysepuffer hervorragend, weil die Kombination aus starkem Detergenz und Reduktionsmittel die enzymatische Aktivität zellulärer Enzyme auf mehreren Ebenen parallel inhibiert.

Zur Präparation eines Gesamtproteinextraktes wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit 2x Laemmli-Lysepuffer lysiert. Mit Hilfe eines Spatels wurde das Zelllysate vereinigt und fünf Minuten bei 95 °C aufgeköcht.

4x Laemmli-Lysepuffer: 125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 15 % (v/v) Glycerol; 4 % (w/v) SDS; 20 % (v/v) β -Mercaptoethanol; Bromphenolblau

2.13.3 Differentielle Proteinextraktion

Unter der differentiellen Extraktion wird die Fraktionierung zellulärer Proteine bzw. kompletter Zellstrukturen verstanden. Mit Hilfe verschiedenster Detergenzien und / oder variierenden Salzkonzentrationen können Proteine in Abhängigkeit ihres Löslichkeitsverhaltens isoliert werden. Für die Analyse von Zell-Zellverbindungsstrukturen kommen in der Regel Zweipuffer-Systeme zum Einsatz, die eine Abtrennung der löslichen von den nicht-löslichen Proteinen erlauben.

Für die Experimente wurde ein Triton X-100-haltiger Extraktionspuffer gewählt, der sowohl die zytoplasmatischen als auch die leicht löslichen, membranösen Zellbestandteile in Lösung bringt. Zur Extraktion wurden die gewünschten Zellen in einer 10 cm Petrischale bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert und zweimal mit eiskaltem TBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen auf Eis gestellt und mit 1 ml Extraktionspuffer für 2 Minuten lysiert. Mit einem Zellschaber wurden beide Fraktionen zusammengeführt und für 15 Minuten bei 13.000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand enthielt die leicht löslichen Proteine und wurde im Verhältnis 3:1 mit 4x Laemmli-Lysepuffer versetzt. Das Pellet enthielt die unlöslichen Proteine und wurde einmal mit TBS gewaschen und in 500 μ l 1x Laemmli-Lysepuffer resuspendiert. Beide Fraktionen wurden für 10 Minuten bei 95 °C gekocht und auf ein SDS-Gel aufgetragen.

Extraktionspuffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 145 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5 % Triton X-100; 1 mM PMSF (frisch zugegeben)

TBS: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl

2.13.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Proteinkonzentrationen wurden photometrisch mit der Methode nach Bradford bestimmt [Bradford, 1976]. Dabei bildet der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 mit den positiven und hydrophoben Seitenketten der Proteine Komplexe, deren Absorptionsmaxima bei 595 nm liegen. Durch Korrelation mit einer erstellten Standardkurve aus bekannten Proteinkonzentrationen war es möglich, für jede Probe einen Wert abzuleiten.

2.13.5 Trichloressigsäure-Fällung von Proteinen (TCA-Fällung)

Proteine können durch verschiedene Lösungsmittel präzipitiert werden. Prinzipiell basiert die Präzipitation auf einer sich ändernden Verteilung hydrophiler und hydrophober Gruppen innerhalb eines Proteins, die mit einem veränderten Löslichkeitsverhalten einhergehen. Hierbei fallen Lösungsmittel Proteine in unterschiedlichem Maße und müssen in Abhängigkeit der weiteren Versuche sorgfältig ausgewählt werden. So protoniert die für die Arbeiten verwendete Trichloressigsäure beispielsweise alle positiv geladenen Seitenketten und führt zur irreversiblen Denaturierung der Proteine.

Für die Proteinpräzipitation wurden die Proben mit Trichloressigsäure (Endkonzentration ca. 10 %) versetzt und für 15 Minuten bei -20 °C eingefroren. Durch Zentrifugation bei 13.000 U/min und 4 °C für 15 Minuten konnten die Proteine pelletiert werden. Anschließend wurde das Pellet mit 100 % und 80 % Aceton gewaschen und für 5 Minuten luftgetrocknet.

2.13.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Größenauftrennung von Proteinen wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese im diskontinuierlichen Puffersystem verwendet. Bei dieser von Laemmli entwickelten Methode werden die Proteine durch unterschiedliche Ionenbewegungen im elektrischen Feld in einem Sammelgel konzentriert und anschließend in einem Trenngel aufgetrennt. Die SDS-Gele wurden in einem Gießstand nach der in Tabelle 2.16 aufgeführten Zusammensetzung angefertigt.

Tabelle 2.16: Zusammensetzung eines 3,5 %igen Sammel- und 10 %igen Trenngels.

Sammelgel (3,5 %)	Trenngel (10 %)
1,2 ml Acrylamid	10 ml Acrylamid
2,5 ml Sammelgel-Puffer	7,5 ml Trenngel-Puffer
6,3 ml Aqua dest.	12,4 ml Aqua dest.
30 µl TEMED	30 µl TEMED
300 µl 10 % APS	300 µl 10 % APS

Die Proteinproben wurden bei einer Stromstärke von 13 mA im Sammelgel gestaucht und bei 25 mA im Trenngel separiert. Ein Größenstandard wurde parallel aufgetragen (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder [Fermentas]). Für die Detektion der Proteine wurde das Gel direkt gefärbt oder ein Western Blot durchgeführt.

4x Sammelgel-Puffer: 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,4 % SDS

4x Trenngel-Puffer: 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,4 % SDS

1x Laufpuffer: 25 mM Tris-Glycin, pH 8,3; 250 mM Glycin; 0,1 % SDS

2.13.7 Detektion von Proteinen und Western Blot

Nach der Gelelektrophorese auf einem SDS-Polyacrylamidgel müssen die Proteine sichtbar gemacht werden. Hierfür besteht die Möglichkeit, die Proteine direkt im Gel anzufärben, wodurch die Gesamtheit der Proteine detektiert wird, oder die Proteine über Western-Blotting spezifisch mit einem Antikörper nachzuweisen. Die verwendete Methode richtet sich nach dem Ziel der Auftrennung.

Für die Anfärbung der Proteine im Polyacrylamidgel wurde der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau R-250 verwendet. Dazu wurde das Gel direkt nach der Gelelektrophorese dreimal für 10 Minuten mit Aqua dest. gewaschen und anschließend für 1 Stunde mit der PageBlue Färbelösung (Fermentas) inkubiert. Coomassie-Brillant-Blau lagert sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren an und ermöglicht die unspezifische Proteindetektion. Anschließend konnte der überschüssige Farbstoff durch kurzes Schwenken in Aqua dest. entfernt werden.

Zur spezifischen Detektion der Proteine wurde der Western Blot eingesetzt. Hierfür mussten die Proteine in einem ersten Schritt vom SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen werden. Dies geschieht in einem senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichteten elektrischen Feld. Dadurch wandern die Proteine aus dem Gel auf die Membranoberfläche und bleiben aufgrund hydrophober Wechselwirkungen auf dieser haften. Zu diesem Zweck wurde das Gel mit einer Nitrozellulose-Membran in eine Blotvorrichtung eingespannt. Anschließend wurde der Blotvorgang bei 500 mA für 1 Stunde in Nass-Blot-Puffer durchgeführt.

Die Effektivität des Transfers wurde durch Anfärbung der Nitrozellulose-Membran mit Ponceau S kontrolliert. Dieser Farbstoff bindet reversibel die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine.

1x Nass-Blot-Puffer: 20 mM Borsäure, pH 8,8 NaOH; 1 mM EDTA

2.13.8 Immunoblotting

An Nitrozellulose gebundene Proteine können mit Hilfe spezifischer Antikörper sehr sensitiv identifiziert werden. Durch Auswahl eines geeigneten Detektionssystems lässt sich das Zielprotein bis in den nanomolaren Bereich nachweisen. Bei der Verwendung Phosphorylierungs-spezifischer Antikörper muss beachtet werden, dass sich diese nicht in Kombination mit Magermilchpulver einsetzen lassen, weil der Anteil an phosphorylierten Proteinen im Magermilchpulver die spezifischen Antikörper abbindet. Aus diesem Grund wird ein Phospo-Antikörper in der Regel in Gegenwart von Rinderalbumin (BSA – bovine serum albumine) oder anderen, teilweise synthetischen Reagenzien inkubiert.

In Abhängigkeit vom verwendeten Antikörper wurde die Nitrozellulose-Membran mit 5 % Magermilchpulver oder 3 % BSA für eine Stunde blockiert. Anschließend wurde der Primärantikörper im entsprechenden Blockierreagenz verdünnt und für eine Stunde mit der Membran inkubiert. Die Nitrozellulose wurde dreimal für 10 Minuten mit TBST gewaschen und für eine Stunde mit dem korrespondierenden Sekundärantikörper in 5 % Milchpulver versetzt. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBST wurde die Membran entwickelt. Hierfür kamen in Abhängigkeit vom Sekundärantikörper zwei Methoden zum Einsatz. Bei Verwendung eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers wurde mit dem SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) nach den Angaben des Herstellers entwickelt. Die Signale konnten anschließend mit einem photosensitiven Film detektiert werden. Bei Verwendung eines Alkalische-Phosphatase-gekoppelten Sekundärantikörpers wurde die Nitrozellulose-Membran in einer speziellen BCIP/NBT-Färbelösung inkubiert und die Signale wurden in Form eines magenta-farbenen Niederschlags auf der Membran sichtbar.

TBST: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,1 % Tween 20

5 % Magermilch: TBST; 5 % Magermilchpulver

3 % BSA: TBST; 3 % BSA Fraktion V

BCIP/NBT-Lösung: 0,1 mM Tris-HCl, pH 9,0; 0,1 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 400 µM BCIP; 400 µM NBT

2.13.9 Immunfluoreszenzfärbung

Bestimmte Moleküle sind in der Lage, Teile des von ihnen absorbierten Lichtes in einer langwelligeren Strahlung wieder abzugeben. Diese so genannten Fluorochrome können in der Fluoreszenz-Mikroskopie verwendet werden, um mikroskopische Präparate direkt oder indirekt zum Fluoreszieren zu bringen. Die Besonderheit der Immunfluoreszenz besteht darin,

dass die Fluorochrome direkt mit dem Antikörper-Molekül assoziiert sind und dadurch eine Fluoreszenzdetektion des Antigens ermöglicht wird. Durch Einsatz verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe können verschiedene Antigene mit unterschiedlichen Fluoreszenzen markiert werden.

Die für die Immunfluoreszenz nach Methode 2.11.5 fixierten Kulturzellen wurden für eine Stunde mit dem in PBS verdünnten Primärantikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Kulturzellen für 30 Minuten mit dem Sekundärantikörper versetzt. Für die Färbung der DNA wurden die Zellen im direkten Anschluss für 30 Sekunden mit DAPI behandelt. Nach drei aufeinander folgenden Waschschritten von je 10 Minuten wurden die Deckgläschen mit Fluoromount G eingebettet und bis zum Erstarren des Einbettmediums bei Raumtemperatur gelagert. Die Färbungen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiophot-2 (Zeiss) ausgewertet.

2.13.10 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation ermöglicht es, aus einem komplexen Zelllysats einzelne Proteine unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers anzureichern. Die gezielte Isolation des Antikörper-Antigen-Komplexes erfolgt in der Regel durch Antikörper-bindende Strukturen, wie beispielsweise Protein G oder A.

Für die Immunpräzipitation wurden die Zellen mit einem Nonidet-P40-haltigem (NP-40) Puffer aufgeschlossen. Dieses nicht-ionische Detergenz führte ausschließlich zur Auflösung der Zellmembran und setzte nur die zytosolischen, leicht löslichen Proteine frei. Durch die Zugabe von Protease- und Phosphatase-Inhibitoren konnten sekundäre Proteinmodifikationen im Zusammenhang mit dem Zellaufschluss unterbunden werden.

Für die Herstellung des Zelllysats wurde die Zellkulturschale zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend für fünf Minuten mit 1 ml NP40-Puffer auf Eis inkubiert. Der Überstand wurde für 15 Minuten bei 4 °C und 13.000 U/min zentrifugiert. Abschließend wurde die Proteinkonzentration des Lysats bestimmt (siehe Abschn. 2.13.4).

Die Präzipitation wurde in 500 µl NP40-Puffer mit 400 µg Zelllysats, 2,5 µg spezifischem Antikörper und 900 µg äquilibrierten Protein G Dynabeads angesetzt. Das Gemisch wurde für zwei Stunden bei 4 °C über Kopf geschwenkt und schließlich mit Hilfe eines Magnetständers (DynaL MPC-S, Dynal) aufgereinigt, wobei sowohl der Durchfluss wie auch alle Waschfraktionen verwahrt wurden. Nach zwei- bis viermaligem Waschen mit NP40-Puffer wurde der Komplex aus Antikörper, Antigen und Dynabeads durch die Zugabe des Elutionspuffers aufgelöst. Das Eluat wurde mit Neutralisationspuffer ausgeglichen und

zusammen mit allen weiteren Proben gefällt (siehe Abschn. 2.13.5). Die Proteinpellets wurden in 1x Laemmli-Lysepuffer resuspendiert und auf einem SDS-Gel aufgetrennt.

NP40-Puffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 % Nonidet P-40

Elutionspuffer: 100 mM Glycin, pH 2,5

Neutralisationspuffer: 1 M Tris-HCl, pH 9,0

Proteaseinhibitoren: 1 mM DTT; 1 μ M Pepstatin; 1 mM PMSF; 1x Protease-Inhibitor-Cocktail ohne EDTA; 1x HALT Phosphatase-Inhibitor-Cocktail

2.13.11 in vitro Kinase-Assay

Im *in vitro* Kinase-Assay wird die Phosphorylierung von Proteinen durch spezifische Kinasen untersucht. Klassischerweise dienen derartige experimentelle Ansätze zur Untersuchung der biochemischen Aktivität von Kinasen hinsichtlich eines zellulären Substrates. In dieser Arbeit soll der *in vitro* Kinase-Assay lediglich zum Nachweis der Phosphorylierung bestimmter Tyrosin-Reste von PKP3 genutzt werden.

Die Tyrosin-Kinase c-Src wurde immunbiochemisch aus löslichen Zellextrakten gewonnen. Zu diesem Zweck wurden HaCaT-Zellen bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert und mit 1 ml Kinase-NP40-Puffer auf Eis lysiert. Die löslichen und unlöslichen Zellextrakte wurden mit einem Spatel vereinigt und kurz zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit einem Pistill homogenisiert und anschließend wurde der gesamte Proteinextrakt für 15 Minuten bei 13.000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und zur Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet. Für die Immunpräzipitation der c-Src-Kinase wurden 700 μ g Proteinextrakt mit 2,5 μ g eines monoklonalen Src-Antikörpers (Klon 17AT28) versetzt. Dem Gemisch wurden 900 μ g äquilibrierte Protein G Dynabeads zugesetzt, um die Antigen / Antikörper-Komplexe zu isolieren. Der Ansatz wurde über Kopf bei 4 °C für zwei Stunden geschwenkt und anschließend mehrmals mit Kinase-NP40-Puffer in einem Magnetständer gewaschen. Für den Kinase-Assay wurde das Pellet in 30 μ l Kinase-Puffer resuspendiert und mit 2 μ g rekombinantem PKP3 (zur Verfügung gestellt von Dr. Ansgar Schmidt) versetzt. Die Mixtur wurde für eine Stunde bei 22 °C inkubiert und abschließend mit 4x Laemmli-Lysepuffer vermengt. Die Proben wurden für fünf Minuten bei 95 °C gekocht und auf ein SDS-Gel geladen.

Kinase-NP40-Puffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 200 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 0,1 % NP40; 1x Phosphatase Inhibitor Cocktail 2

Kinase-Puffer: 25 mM Tris-HCl, pH 6,8; 25 mM MgCl₂; 5 mM MnCl₂; 0,5 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,25 mM Na₃VO₄; 100 μ M ATP)

2.13.12 2D-Gelelektrophorese

Der isoelektrische Punkt (pI) ist ein grundlegendes Charakteristikum von Proteinen und wird durch ihre Primärstruktur definiert. Er gibt einen bestimmten pH-Wert an, bei dem sich die Ladungen der negativen Säuregruppen mit den Ladungen der positiven Aminogruppen aufheben und das Protein eine neutrale Gesamtladung aufweist. Bei der isoelektrischen Fokussierung wird diese biochemische Eigenschaft der Proteine ausgenutzt, um eine Auftrennung nach dem isoelektrischen Punkt zu erreichen. Die Kombination mit der SDS-PAGE führt zu einer weiteren Steigerung der Trennauflösung und wird unter dem Begriff der Zweidimensionalen (2D)-Gelelektrophorese zusammengefasst.

Für die Herstellung eines Gesamtprotein-Extraktes wurden $1,5 \times 10^7$ HaCaT-Zellen trypsinisiert und das Pellet in 1 ml 2D Probenpuffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte per Ultraschall (Ausgangsleistung 2, Tastgrad 40%, kontinuierlicher Impuls für 30 Sekunden [Cell Disruptor B15, Branson Sonifier]). Der Aufschluss wurde lichtmikroskopisch kontrolliert (Lichtmikroskop CH-2, Olympus) und die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 13.000 U/min für 5 Minuten pelletiert. 200 μ l des Überstandes wurden mit Hilfe des 2D-CleanUp Kits den Angaben des Herstellers entsprechend aufgereinigt (Bio-Rad). Das resultierende Protein-Pellet wurde in 125 μ l Rehydratisierungs-Puffer resuspendiert, wobei unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation abgeschieden wurden. Für die isoelektrische Fokussierung wurde ein ReadyStrip IPG Streifen mit einem Fokussierungsbereich von pH 7 – 10 verwendet (Bio-Rad). Der Gelstreifen wurde über Nacht mit der Proteinlösung rehydratisiert und am nächsten Tag nach den Angaben des Herstellers fokussiert. Um den Gelstreifen für die 2. Dimension vorzubereiten, wurde dieser für jeweils 15 Minuten mit Äquilibrations-Puffer 1 und 2 inkubiert. Anschließend wurde der Gelstreifen auf ein SDS-Gel geladen und mit 0,8 % Agaroselösung überschichtet. Die SDS-PAGE wurde entsprechend Abschnitt 2.13.7 durchgeführt.

2D Probenpuffer: 1x PBS; 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 1 µM Pepstatin; Protease Inhibitor Cocktail EDTA-frei; Phosphatase Inhibitor Cocktail 2

Rehydratisierungs-Puffer: 7 M Harnstoff; 2 M Thioharnstoff; 2 % CHAPS; 0,5 % Ampholyte 6 – 11; 30 mM Tris; 1,2 % DeStreak

Äquibrierungs-Puffer 1: 50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 6 M Harnstoff; 30 % Glycerol; 2 % SDS; 0,5 % DTT

Äquibrierungs-Puffer 2: 50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 6 M Harnstoff; 30 % Glycerol; 2 % SDS; 4,5 % Iodacetamid

2.13.13 Immunhistochemische Färbungen von Geweben

Als Immunhistochemie wird die Färbung von Gewebsschnitten mit spezifischen Antikörpern bezeichnet. Hierfür wurden humane Gewebsschnitten aus dem Archiv des Instituts für Pathologie verwendet. Diese waren mit 10 % Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Für die immunhistochemische Färbung wurden mit Hilfe eines Mikrotoms Gewebsschnitte (Schnittdicke: 3 – 4 µm) angefertigt und auf Objektträger übertragen. Vor der Färbung musste das Gewebe entparaffiniert werden. Hierfür wurden die Schnitte mit Xylol behandelt und anschließend in einer abnehmenden Ethanolreihe (100 % - 96 % - 70 %) inkubiert. Zur immunhistochemischen Färbung des desmosomalen Proteins PKP3 wurden die Antigene durch eine Kombination von Hitze und Enzym-Verdau demaskiert. Die entparaffinierten Präparate wurden für drei Minuten in einer Natriumcitrat-Lösung bei 115 °C in der Mikrowelle erhitzt, anschließend mit Aqua dest. gespült und mit Trypsin bei 37 °C weiterbehandelt. Für die immunhistochemische Färbung der c-Src-Kinase wurden die Antigene lediglich mit Trilogy (Cell Marque) demaskiert. Die Gewebsschnitte wurden erneut mit Aqua dest. gewaschen und in einem Immunfärbeautomaten (Autostainer Plus, Dako) nach den Angaben des Herstellers mit den jeweiligen Antikörpern hybridisiert. Für die Detektion der Primärantikörper wurde das EnVision Detection System Peroxidase / DAB, Rabbit / mouse (Dako) verwendet und die Gegenfärbung wurde mit REAL Hematoxylin (Dako) durchgeführt. Anschließend wurden die gefärbten Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 % - 96 % - 100 %) dehydriert und mit Xylol behandelt. Die Schnitte wurden mit Eukitt eingebettet und anschließend Lichtmikroskopisch analysiert und dokumentiert (Durchlichtmikroskop DMRB mit Digitalkamera DFC320, Leica Microsystems).

Natriumcitrat-Lösung: 10 mM Na-Citrat, pH 6,0

Trypsin-Lösung: 50 mM Tris-HCl, pH 7,8; 0,001 % Trypsin; vorgewärmt auf 37 °C

2.13.14 Expression des PKP3 N-Terminus in *Escherichia coli*

Zur Expression des rekombinanten PKP3 N-Terminus wurden kompetente *Escherichia coli* XL1-Blue MRF Kan^R mit dem Expressionsplasmid pQE30-PP3-His transformiert. Nach Inkubation der LB-Amp-Platten über Nacht bei 37 °C wurde eine Vorkultur von 3 ml LB-Amp-Medium mit einer Kolonie beimpft. Diese wurde bei 37 °C im Horizontalschüttler über Nacht inkubiert und am folgenden Tag für das Animpfen einer 50 ml Hauptkultur verwendet. Anschließend wurde die Bakterienkultur unter starkem Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Da die Translation des PKP3-Genabschnitts unter der Kontrolle des lac-Operators stand, konnte die spezifische Expression durch die Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration) induziert werden. Die Kultur wurde für weitere 2 Stunden auf dem Horizontalschüttler bei 37 °C inkubiert, wobei in 30-minütigen Abständen jeweils 1 ml Probe entnommen wurde.

Die entnommenen Proben wurden bei 5.000 U/min für fünf Minuten zentrifugiert und das Bakterienpellet mit 1x Laemmli-Lysepuffer lysiert. Zur Kontrolle der PKP3-Expression wurden die Proteinproben per SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt.

2.13.15 Screening von cDNA-Bibliotheken mit Hilfe Phosphorylierungs-spezifischer Antikörper

Für die Isolation der Protein-Tyrosin-Kinasen stand eine Phagemid-basierte cDNA-Expressions-Bibliothek auf Grundlage des Uni-ZAP XR-Vektors von Agilent zur Verfügung. Dieses System kombiniert die Eigenschaften einer Lambda-Expressions-Bibliothek mit der Möglichkeit der *in vivo* Exzision des pBluescript Phagemids. Die Bibliothek wurde aus mRNA aus Lebergewebe generiert und freundlicher Weise von Prof. Dr. Manser (Institut für Toxikologie und Pharmakologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) zur Verfügung gestellt. Als bakterieller Wirtstamm wurden *Escherichia coli* XL1-Blue MRF Kan^R verwendet. Dieser Stamm besaß das F'-Episom, welches sowohl für die Infektion als auch für die lac-Repressor-abhängige Expression der cDNA-Konstrukte notwendig war. Darüber hinaus wurde dieser Stamm mit einem pQE30-NPP3-Konstrukt transformiert, welches für die PKP3-Kopfdomäne kodiert und ebenfalls unter der Kontrolle des lac-Repressors stand (siehe Abschn. 3.9). Zur Präparation der Wirtsbakterien wurde eine XL1-Blue MRF Kan^R pQE30-NPP3 Übernachtskultur in Ampicillin-haltigem LB-Medium angesetzt. Dem Medium wurden 10 mM Magnesiumsulfat und 0,2 % Maltose zugesetzt. Diese Supplemente führen zur Ausbildung von Oberflächenrezeptoren, die auch für die Adsorption der Phagen notwendig sind. Die Kultur wurde bei 37 °C über Nacht auf dem

Horizontalschüttler inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 3.500 U/min und 4 °C abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 0,4 Volumen 10 mM Magnesiumsulfat resuspendiert und bei 4 °C gelagert.

Für die Infektion wurden 200 µl der präparierten Übernachtskultur mit der gewünschten Menge an Plaque Forming Units (pfu) infiziert. Die Phagen-Bakterien-Suspension wurde für 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, um die Adsorption der Phagen an die Bakterien zu ermöglichen. Anschließend wurde die Suspension mit Topagarose (42 °C) gemischt und auf eine vorgewärmte Phagen-LB-Amp-Platte (37 °C) aufgetragen. Nach 15 Minuten bei Raumtemperatur war die Topagarose erstarrt und die Platten wurden für drei bis vier Stunden im Brutschrank bei 42 °C kultiviert. In der Zwischenzeit wurden Nitrozellulose-Rundfilter in 20 mM IPTG getränkt. Nach visueller Überprüfung der Plaquesdurchmesser (ca. 1 mm) wurden die getrockneten Filter auf die Platten gelegt und deren Position mit Tusche markiert. Nach weiteren vier Stunden bei 37 °C wurden die Filter abgehoben, dreimal für 10 Minuten mit TBST gewaschen und über Nacht in 3 % BSA blockiert. Am nächsten Tag wurde mit einem Phospho-Tyrosin-spezifischen Antikörper ein Immunoblot durchgeführt. Um die Detektion positiver Plaques zu erleichtern, wurden die Nitrozellulose-Filter mit einer BCIP/NBT-Färbelösung entwickelt, weshalb ein Alkalische Phosphatase-gekoppelter Sekundärantikörper verwendet wurde.

Die positiven Plaques wurden ausgestanzt und in 200 µl SM-Puffer für 6 Stunden über Kopf geschwenkt. Um die Bakterien abzutöten, wurde dem Puffer 10 % Chloroform zugesetzt.

SM-Puffer: 50 mM Tris-HCl pH, 7,5; 100 mM NaCl; 10 mM MgSO₄; 0,01 % Gelatine

Phagen-LB-Agar: LB-Agar mit LE-Agarose; 10 mM MgSO₄

Topagarose: LB-Agar mit LE-Agarose

2.13.16 in vivo Exzision des pBluescript Phagemids mit einem Helfer-Phagen

Die verwendete cDNA-Bibliothek auf Basis des Lambda Uni-ZAP XR Vektors ermöglichte die Exzision des Phagemids und des kodierten cDNA-Inserts unter Zuhilfenahme eines Helfer-Phagen. Hierbei erkennen Proteine des Helfer-Phagen spezifische DNA-Signaturen innerhalb des Uni-ZAP XR Vektors und bilden ein einzelsträngiges, zirkuläres DNA-Molekül, welches in filamentöse Phagenpartikel verpackt wird. Auf diese Weise wird das pBluescript Phagemid mit dem entsprechenden cDNA-Insert aus dem Uni-ZAP XR Vektor *in vivo* herausgeschnitten.

Für die *in vivo* Exzision wurden 200 µl präparierte Wirtsbakterien mit dem Kinase positiven Phagenklon und dem ExAssist Helfer-Phagen vermennt und 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. LB-Medium wurde 10 mM Magnesiumsulfat und 0,2 % Maltose zugesetzt und zur Phagen-Bakterien-Suspension gegeben. Nach dreistündiger Kultivierung bei 37 °C auf dem Horizontalschüttler wurde der Ansatz 20 Minuten bei 70 °C im Wasserbad erhitzt. In dieser Phase wird ein Großteil der Lambda-Phagen zerstört und außerdem werden die filamentösen Partikel durch Lyse der Bakterien freigesetzt. Durch Zentrifugation bei 3.500 U/min für 15 Minuten können die filamentösen Phagen abgetrennt werden.

Mit den filamentösen Phagen wurde eine *Escherichia coli* SOLR-Stamm infiziert. In diesem Stamm kann sich der filamentöse Phage nicht vermehren und kontaminierende Lambda-Phagen sind nicht in der Lage, diesen zu infizieren. Aus dem einzelsträngigen DNA-Molekül wurde ein doppelsträngiges pBluescript Phagemid assembliert, welches zur weiteren Analyse verwendet werden konnte. Da sich das Phagemid im SOLR-Stamm schlecht replizierte, wurde dieses in den Stamm XL1-Blue MRF Kan^R kloniert.

3. Ergebnisse

3.1 Analyse von posttranslationalen Modifikationen von Plakophilin 3

Die Vielfalt posttranslationaler Modifikationen hat unterschiedlichste Auswirkungen auf die biochemische Natur von Proteinen. Eine probate Analysemethode ist die zweidimensionale Gelelektrophorese, da sie sowohl Änderungen des Molekulargewichts als auch des isoelektrischen Verhaltens erfasst. Um eine erste Aussage über die posttranslationalen Modifikationen von Plakophilin 3 (PKP3) zu gewinnen, wurde ein Gesamtproteinextrakt aus der humanen Keratinozyten-Zelllinie HaCaT hergestellt und in der 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Anhand der abgeleiteten Aminosäure-Sequenz von PKP3 konnte ein isoelektrischer Punkt von pH 9,39 vorhergesagt werden, weshalb die isoelektrische Fokussierung in einem Bereich von pH 7 bis pH 10 durchgeführt wurde. In der 2. Dimension wurden die fokussierten Proteine auf einem 10%-igen SDS-Gel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die immunbiochemische Detektion von PKP3 erfolgte mit polyklonalen Antikörpern (P3-3) und ist in der folgenden Abbildung 3.1 dargestellt.

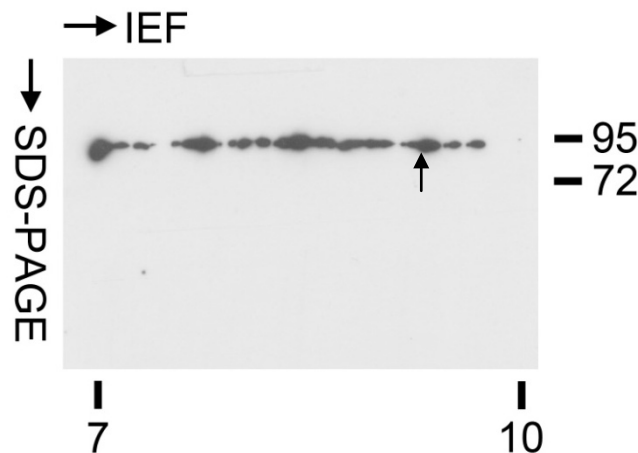


Abbildung 3.1: Zweidimensionale Gelelektrophorese von PKP3.

Ein HaCaT Gesamtproteinextrakt wurde in der 1. Dimension in einem pH-Bereich von pH 7 bis pH 10 isoelektrisch fokussiert (IEF) und in der 2. Dimension nach dem Molekulargewicht aufgetrennt (SDS-PAGE). Nach dem Western Blot wurde die Nitrozellulose-Membran mit polyklonalen PKP3-Antikörpern hybridisiert. Der isoelektrische Punkt von PKP3 wurde bei 9,39 markiert (Pfeil). Molekulargewichte sind in Kilodalton (kDa) angegeben.

Die Western Blot Hybridisierung zeigte eine Vielzahl isoelektrischer PKP3-Varianten über den gesamten untersuchten pH-Bereich. Neben einzelnen Spots mit variierender Intensität traten vor allem breitere Signalgruppen mit geringer Detailauflösung auf. Die Position des vorhergesagten isoelektrischen Punktes von PKP3 wurde aufgrund des linearen pH-Gradienten des ReadyStrip IPG-Streifens abgeleitet (Bio-Rad). Hier trat keine erhöhte Menge von PKP3 auf. Interessanterweise wurde aber eine Akkumulation von PKP3 am neutralen

Ende des Fokussierungsbereichs beobachtet, die auf weitere isoelektrische Varianten unterhalb des untersuchten pH-Bereiches hindeutete. Die enorme Verschiebung des isoelektrischen Punktes von PKP3 dürfte in erster Linie auf Phosphorylierungen zurückzuführen sein, da die eingebrachten Negativladungen besonders bei sehr basischen Proteinen zu großen pI-Sprüngen führen [Zhu *et al.*, 2005]. Dies konnte durch *in silico* Berechnungen bestätigt werden (PhosphoSitePlus). Bei diesen Kalkulationen wurde, ausgehend von der PKP3-Aminosäure-Sequenz, der Einfluss einzelner oder mehrerer Phosphorylierungen auf den isoelektrischen Punkt berechnet (vgl. Tab. 3.1).

Tabelle 3.1: Auswirkung der Phosphat-Gruppen-Addition auf den isoelektrischen Punkt von PKP3 (nach PhosphoSitePlus).

Anzahl Phosphatgruppen	Isoelektrischer Punkt (pI)
0	9,39
1	9,29
2	9,18
3	9,06
4	8,91
5	8,73
6	8,5
7	8,2
8	7,86
9	7,57
10	7,36
11	7,19

Dennoch war es unter Zuhilfenahme dieser Methode nicht möglich, dem komplexen Detektionsmuster in Abbildung 3.1 einzelne Phosphorylierungen direkt zuzuordnen. Hier können andere Modifikationen ebenfalls einen Einfluss auf das isoelektrische Verhalten von PKP3 haben. Andere Modifikationen, wie Acetylierungen und Methylierungen wurden für PKP3 im Rahmen entsprechender Analysen ebenfalls nachgewiesen (PhosphoSitePlus). Veränderungen hinsichtlich des Molekulargewichtes von PKP3 wurde nicht beobachtet.

3.2 Nachweis der Tyrosin-Phosphorylierung von Plakophilin 3

Die 2D-Gelelektrophorese legte nahe, dass PKP3 an mehreren Aminosäure-Resten gleichzeitig phosphoryliert vorliegt. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurde PKP3 mit polyklonalen Antikörpern (P3-3) spezifisch aus dem löslichen Proteinextrakt von HaCaT-Zellen immunpräzipitiert. Die Präzipitations-Produkte wurden auf einem 10%-igen SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Die immunbiochemische Kontrolle der Präzipitation erfolgte mit einer Mischung der monoklonalen Antikörper gegen PKP3 (Klone PKP3-270.6.2 und PKP3-310.9.1) und zeigte ein spezifisches Signal bei ~87 kDa. Das zusätzliche Signal bei ~70 kDa stellte wahrscheinlich ein stabiles Degradationsprodukt von PKP3 dar. Die Phosphorylierung von Tyrosin(en) in PKP3 wurde mit einem monoklonalen phospho-Tyrosin-spezifischen Antikörper (pY20) nachgewiesen, der ein schwaches Signal auf der Höhe von PKP3 zeigte. Dies ist in Abbildung 3.2 A veranschaulicht.

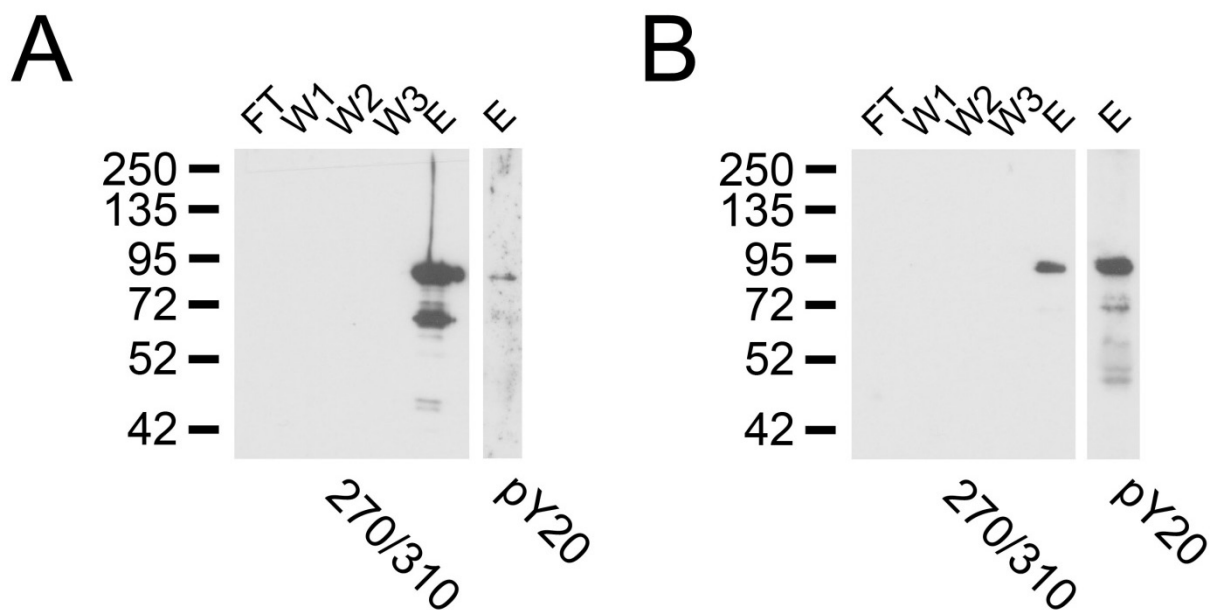


Abbildung 3.2: Tyrosin-Phosphorylierung von PKP3 in Abhängigkeit von Pervanadate.

Aus unbehandelten (A) oder Pervanadat-behandelten (B) HaCaT-Zellen wurde ein löslicher Proteinextrakt hergestellt und für die Immunpräzipitation (IP) von PKP3 verwendet. Die Proteine aller Fraktionen der IP (FT, W1, W2, W3 und E) wurden nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die Präzipitation wurde mit einer Mischung der monoklonalen Antikörper gegen PKP3 (270/310) überprüft. Zum Nachweis der Tyrosin-Phosphorylierung wurde ein phospho-Tyrosin-spezifischer Antikörper (pY20) verwendet. Molekulargewichte der Referenzproteine sind in Kilodalton (kDa) angegeben.

Die Tyrosin-Phosphorylierung von PKP3 konnte in mehreren experimentellen Wiederholungen nicht regelmäßig nachgewiesen werden, was vermutlich auf eine variierende Effizienz der Immunpräzipitation zurückzuführen ist. Das Vorhandensein von Serin- und

Threonin-Phosphorylierungen wurde an PKP3 bereits früher nachgewiesen (Dr. Jäger, persönliche Mitteilung) und sollte für die weitere Arbeit eine untergeordnete Rolle spielen. Im Folgenden wurde der Effekt des Tyrosin-Phosphatase-Inhibitors Pervanadat auf die Phosphorylierung von PKP3 untersucht. Der Einsatz dieser Substanz resultiert in einer intensiven Tyrosin-Phosphorylierung zellulärer Proteine, da die De-Phosphorylierungen durch die irreversible Inhibition von Tyrosin-Phosphatasen verhindert werden. Diese Effekte wurden bereits früher auch an den desmosomalen Proteinen Desmoglein 2 und Plakoglobin beobachtet [Garrod *et al.*, 2008b]. Zu diesem Zweck wurden HaCaT-Zellen vor der Extraktion löslicher Proteine mit 0,1 mM Pervanadat für 15 Minuten behandelt. Für die Immunpräzipitation aus den Extrakten und die Detektion der Präzipitations-Produkte wurden die bereits beschriebenen Antikörper verwendet (siehe oben). Ein repräsentatives Ergebnis mehrerer Wiederholungen dieses Experiments der Western Blot-Hybridisierung ist in Abbildung 3.2 B dargestellt. Hieraus ergibt sich, dass die Pervanadat-Behandlung die anscheinend transienten Tyrosin-Phosphorylierungen von PKP3 deutlich zu stabilisieren vermag.

3.3 Quantitative Tyrosin-Phosphorylierung von PKP3

Die bisherigen Ergebnisse gaben lediglich Auskunft über die qualitative Phosphorylierung von PKP3. Um eine quantitative Aussage über die Relevanz einzelner Tyrosin-Phosphorylierungen zu bekommen, wurde die Datenbank PhosphoSitePlus hinzugezogen. Hierbei handelt es sich um eine regelmäßig aktualisierte Sammlung von Phosphotomics Ergebnissen, die aus massenspektrometrischen Untersuchungen verschiedenster biologischer Proben hervorgehen. Die *in silico* Analyse von PKP3 ergab mehrere Tyrosin-Phosphorylierungsstellen, sowohl in der Kopf- als auch in der Armadillo-Domäne. In Tabelle 3.2 werden einzelne hierbei gefundene PKP3 Tyrosin-Phosphorylierungen hinsichtlich ihrer Detektions-Häufigkeit aufgeführt.

Tabelle 3.2: Häufigkeit des Auftretens einzelner Phosphorylierungen von PKP3 in einzelnen massenspektrometrischen Analysen (nach PhosphoSitePlus, Stand 13.11.2012).

Tyrosin-Rest	Häufigkeit in Analysen	PKP3-Domäne
Y84	490	Kopf
Y114	27	Kopf
Y176	499	Kopf

Tyrosin-Rest	Häufigkeit in Analysen	PKP3-Domäne
Y195	139	Kopf
Y210	111	Kopf
Y303	12	Kopf
Y390	183	Armadillo
Y539	2	Armadillo

In Relation wurden fünf PKP3-Tyrosin-Reste besonders oft im phosphorylierten Zustand nachgewiesen (Y84, Y176, Y195, Y210, Y390). Neben diesen und den hier aufgeführten Phosphorylierungen existieren weitere, die jedoch weitaus seltener nachgewiesen wurden. Da der Modifikation der genannten fünf Tyrosin-Reste womöglich eine substantiellere Bedeutung zukommt, sollten diese im Zuge der weiteren Arbeiten untersucht werden.

3.4 Vektorkonstruktionen zur Analyse der Tyrosine am PKP3 N-Terminus

Die in Abschnitt 3.3 beschriebenen Tyrosine, die bei massenspektrometrischen Analysen häufiger im phosphorylierten Zustand detektiert wurden, waren hier von besonderem Interesse. Deswegen sollten cDNA-Konstrukte für die fünf Tyrosin-Reste erstellt werden, bei denen diese durch sequenzspezifische Mutagenesen ausgetauscht werden sollten, um die Bedeutung dieser Aminosäuren im Hinblick auf die Eigenschaften von PKP3 näher zu untersuchen. Darüber hinaus wurde auch ein Serin-Rest (S196) untersucht.

3.4.1 Mutationsvarianten und allgemeine Klonierungsstrategie

Zur Untersuchung der Phospho-Aminosäuren wurden diese durch gezielte Nukleotid-Mutationen substituiert. Die Auswahl eines geeigneten Substituenten berücksichtigte die strukturellen Eigenschaften der zu verändernden Aminosäure. Aus diesem Grund wurde die Aminosäure Tyrosin mit Phenylalanin substituiert. Wie Abbildung 3.3 zu entnehmen ist, unterscheiden sich beide Aminosäuren lediglich durch das Vorhandensein einer Hydroxylgruppe an der aromatischen Seitenkette.



Abbildung 3.3: Strukturvergleich zwischen Tyrosin und Phenylalanin. Phenylalanin und Tyrosin unterscheiden sich im chemischen Charakter der aromatischen Seitenkette.

Mit den gleichen Anforderungen wurde ein geeigneter Substituent für Serin ausgewählt. Diese Aminosäure wurde durch Nukleotid-Substitution zum Alanin mutiert. Die Seitenkette des Alanins präsentierte ein Wasserstoffatom anstatt einer Hydroxylgruppe. Abbildung 3.4 verdeutlicht die Unterschiede beider Aminosäuren.



Abbildung 3.4: Strukturunterschiede zwischen Serin und Alanin. Die vereinfachte Strukturformel des Alanins zeigt die Methylgruppe an der Seitenkette der Aminosäure, wohingegen Serin an dieser Position durch eine Hydroxymethylgruppe gekennzeichnet ist.

Biophysikalische Änderungen der Proteinstruktur wurden bei der Auswahl der Substituenten nicht berücksichtigt.

Für die Arbeiten konnte zum Teil auf bereits bestehende Mutationen zurückgegriffen werden (zur Verfügung gestellt von Dr. A. Schmidt). Diese befanden sich in der cDNA des menschlichen PKP3, kloniert in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA6/V5-His A PKP3-CKT3 bzw. in den Vektor pBluescript R3-NPP3. Für die weiteren Klonierungen standen diese Konstrukte direkt zur Verfügung. In Tabelle 3.3 sind alle vorhandenen Mutationen zusammengefasst.

Tabelle 3.3: Bestehende Mutationskonstrukte aus den Vorarbeiten.

Bezeichnung	Mutation
pBluescript R3-NPP3-Y84F	Substitution Y84 nach F84
pBluescript R3-NPP3-Y176F	Substitution Y176 nach F176

Bezeichnung	Mutation
pBluescript R3-NPP3-Y390F	Substitution Y390 nach F390
pcDNA6 PKP3-CKT3-Y84F	Substitution Y84 nach F84
pcDNA6 PKP3-CKT3-Y176F	Substitution Y176 nach F176
pcDNA6 PKP3-CKT3-Y195F	Substitution Y195 nach F195
pcDNA6 PKP3-CKT3-Y210F	Substitution Y210 nach F210
pcDNA6 PKP3-CKT3-Y390F	Substitution Y390 nach F390

Diese Mutationen wurden, wie bereits erwähnt, um eine Serin-Substitution an Position S196 erweitert und schließlich in einer Kombinationsmutante vereinigt.

3.4.2 Konstruktion der S196A-Mutation

3.4.2.1 Mutagenese zur Konstruktion der S196A-Mutation

Die Mutation von Serin S196 zu Alanin A196 wurde durch Mutagenese des Vektors pBluescript R3-NPP3 hergestellt. Dabei wurden die Nukleotide an Position 660 und 661 mit Hilfe mutierter Oligonukleotide gezielt ausgetauscht, wodurch auf Aminosäureebene aus dem ursprünglichen Serin (AGC) ein Alanin (GCC) generiert wurde. In Abbildung 3.5 ist die Mutagenese unter Verwendung der veränderten Oligonukleotide dargestellt.

PP3 S196A fw 5'- CCTGGACGACCGCTACGCCCTGGTGTCTGAGCAG -3'
 631 - TGGGGCCCCGGGGCCTGGACGACCGCTACAGCCTGGTGTCTGAGCAGCTGGAGCCCGC...
 3'- GGACCTGCTGGCGATGCGGGAACACAGACTCGTC -5' PP3 S196A rev

Abbildung 3.5: Mutagenese von pBluescript R3-NPP3 zur Konstruktion der S196A-Mutation. Die pBluescript R3-NPP3-Sequenz (schwarz) wird mittels der Oligonukleotide (blau) an Aminosäureposition 196 mutiert. Durch den Austausch von zwei Nukleotiden (rot) wird auf Aminosäureebene aus einem Serin (AGC) ein Alanin (GCC) erzeugt (gelb).

Das entstandene Plasmid wurde pBluescript R3-NPP3-S196A bezeichnet und diente als Ausgangskonstrukt für die Einbringung der Mutation S196A in den Vektor pcDNA6 PKP3-CKT3.

3.4.2.2 Konstruktion von pcDNA6 PKP3-CKT3-S196A

Zusätzlich zu den bereits vorhandenen Mutationen (siehe Tab. 3.3) sollte auch die Mutation S196A in den Vektor pcDNA6/V5-His A PKP3-CKT3 eingebracht werden. Hierfür wurde die Mutation über die Restriktionsendonuklease *Sbf*I, das in PKP3 an Nukleotidposition 337 und 1081 schneidet, in den Vektor kloniert. Da es sich um eine ungerichtete Klonierung handelte,

musste die Orientierung des eingefügten Fragments über eine Kontrollspaltung mit *Xho*I überprüft werden. Das vollständige Plasmid wurde pcDNA6 PKP3-CKT3-S196A bezeichnet.

3.4.3 Konstruktion der Kombinationsmutante aus allen Phospho-Aminosäure-Mutationen

Mit dem Ziel, die Funktion der Phosphorylierungen im Kollektiv zu untersuchen, wurde eine Kombinationsmutante angefertigt. Mit dieser wurde der Effekt mehrerer Phospho-Aminosäure-Mutationen auf die PKP3-Eigenschaften studiert, der bei Untersuchung der Einzelmutationen nicht aufgelöst werden konnte. Im Folgenden ist das chronologische Klonierungsschema zur Konstruktion des Y84F-Y176F-Y195F-S196A-Y210F-Y390F-Vektors dargestellt.

3.4.3.1 Konstruktion der Y195F-S196A-Doppelmutation

Als Ausgangskonstrukt für die Herstellung der Kombinationsmutante wurde der Vektor pBluescript R3-NPP3-S196A gewählt. In einem ersten Schritt wurde die Mutation des Tyrosins an Position Y195 erzeugt. Hierfür wurde die in Abbildung 3.6 dargestellte Mutagenese durchgeführt, bei welcher Adenin an Nukleotidposition 658 durch ein Thymidin ausgetauscht wurde. Auf Aminosäureebene konnte durch diese Substitution ein Phenylalanin generiert werden.

```

PP3 Y195F fw 5'- GGGCCTGGACGACCGCTTCGCCCTGGTGTCTGAG -3'
631 - TGGGGCCCGGGGCGCTGGACGACCGCTACGCCCTGGTGTCTGAGCAGCTGGAGCCCGC...
3'- CCCGGACCTGCTGGCGAAGCGGGACCACAGACTC -5' PP3 Y195F rev
  
```

Abbildung 3.6: Mutagenese von pBluescript R3-NPP3-S196A zur Konstruktion der Y195F-Mutation. Der Vektor pBluescript R3-NPP3-S196 (schwarz) wird mit Hilfe mutierter Oligonukleotide (**blau**) um die Mutation Y195F erweitert. Hierfür wird Adenin an Position nt 658 durch ein Thymidin ausgetauscht (**rot**), wodurch es zum Aminosäurewechsel nach Phenylalanin kommt (**gelb**). Die bereits existierende S196A-Mutation ist unterstrichen.

Das Konstrukt wurde pBluescript R3-NPP3-Y195F-S196A bezeichnet.

3.4.3.2 Erweiterung der Y195F-S196A-Mutante um die Mutation Y210F

Da es nicht möglich war, die Aminosäuremutation an Tyrosin Y210 über Restriktionsspaltungen einzubeziehen, musste auch diese über eine Mutagenese realisiert werden. Hierfür wurde im Vektor pBluescript R3-NPP3-Y195F-S196A Alanin an Nukleotidposition 703 zum Thymidin substituiert. Durch diese Mutation wird aus dem kodierten Tyrosin ein Phenylalanin. Abbildung 3.7 verdeutlicht die durchgeführte Mutagenese unter Verwendung der angegebenen Oligonukleotide.

```

pkp3 y205f sense 5'- GCGGCCACCTCCACCTTCAGGGCCTTTGCGTACG -3'
680 - GGAGCCCGCGGCCACCTCCACCTACAGGGCCTTTGCGTACGAGCGCCAGGCCAGCT...
3'- CGCCGGTGGAGGTGGAAGTCCCGGAAACGCATGC -5'
pkp3 y205f antisense

```

Abbildung 3.7: Mutagenese von pBluescript R3-NPP3-Y195F-S196A zur Konstruktion der Y210F-Mutation. Die Nukleotidsubstitution an Position 703 von Alanin nach Thymidin (rot) führt zum Aminosäurewechsel nach Phenylalanin (gelb).

Die Triple-Mutante wurde pBluescript R3-NPP3-Y195F-S196A-Y210F bezeichnet.

3.4.3.3 Konstruktion von pBluescript R3-NPP3-Y176F-Y195F-S196A-Y210F

Die Mutation an Tyrosin Y176F konnte über eine *BspEI* / *SmaI*-Klonierung in die Triple-Mutante einbezogen werden. *BspEI* schneidet in PKP3 an Nukleotidposition 5 und *SmaI* an Position 635. Die Klonierungsstrategie ist im Folgenden schematisch dargestellt.

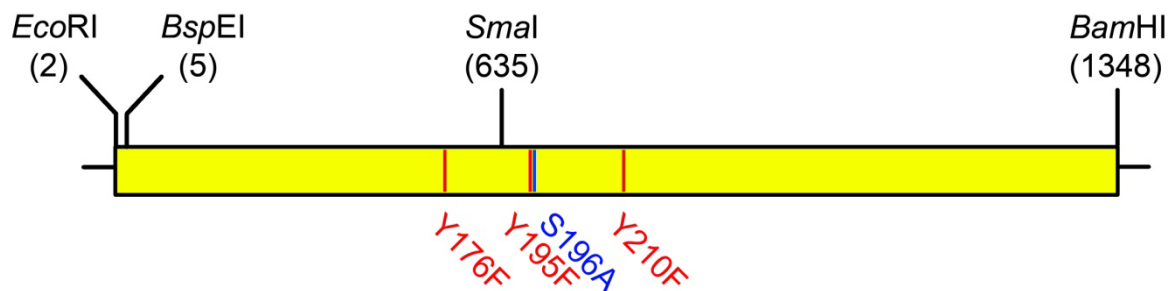


Abbildung 3.8: Konstruktion des Vektors pBluescript R3-NPP3-Y176F-Y195F-S196A-Y210F. Die Y176F-Mutation wird aus dem pBluescript R3-NPP3-Y176F-Konstrukt gewonnen und über *BspEI* / *SmaI* kloniert. Die angegebenen Werte entsprechen den Nukleotidpositionen in der publizierten PKP3 cDNA (GenBank Acc.No. NM_007183; gelb).

Für die Konstruktion von pBluescript R3-NPP3-Y176F-Y195F-S196A-Y210F wurde das Y176F-Fragment aus dem bereits bestehenden pBluescript R3-NPP3-Y176F über eine *BspEI* / *SmaI*-Restriktion gewonnen und in die Triple-Mutante kloniert.

3.4.3.4 Konstruktion der pBluescript R3-NPP3-Y84F-Y390F-Mutante

Für die Kombination der Tyrosin-Mutationen an Position Y84F und Y390F konnte auf die beiden bereits vorhandenen pBluescript-Vektoren zurückgegriffen werden (siehe Tab. 3.3). Die Mutationen ließen sich über *BspEI* und *BsiWI* vereinigen. Zu diesem Zweck wurde pBluescript R3-NPP3-Y84F mit *BspEI* / *BsiWI* verdaut, wodurch ein 710 bp Fragment gewonnen wurde, welches die Y84F-Mutation enthielt. Durch Ligation mit *BspEI* / *BsiWI*-verdaulichem pBluescript R3-NPP3-Y390F wurde die gewünschte Doppelmutante erzeugt. Abbildung 3.9 verdeutlicht den Klonierungsschritt.

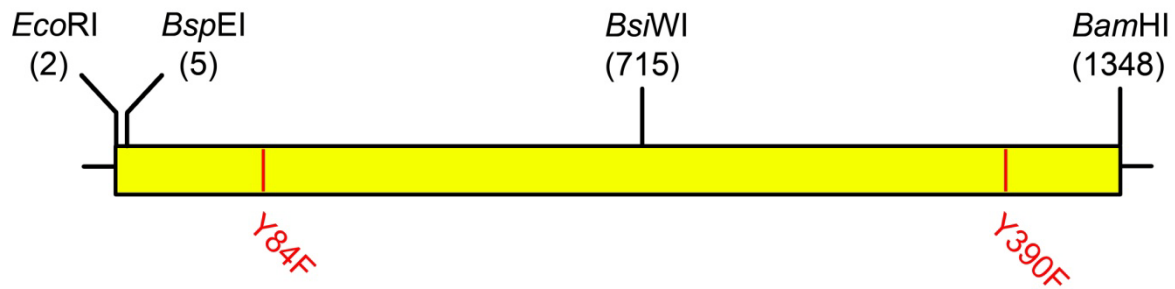


Abbildung 3.9: Konstruktion des Vektors pBluescript R3-NPP3-Y84F-Y390F.

Über *BspEI* / *BsiWI* kann die Y84F-Mutation aus pBluescript R3-NPP3-Y84F in pBluescript R3-NPP3-Y390F kloniert werden. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme sind in Nukleotidpositionen der PKP3-cDNA angegeben (vgl. Abb. 3.8).

3.4.3.5 Vereinigung aller sechs Mutationen in pBluescript R3-NPP3

Um alle generierten Mutationen in einem pBluescript-Konstrukt zu vereinigen, wurde das Restriktionsenzym *SbfI* verwendet. *SbfI* schneidet im PKP3-N-Terminus an den Nukleotidpositionen 337 und 1081 und ermöglicht es die vier Mutationen Y176F-Y195F-S196A-Y210F mit der Y84F-Y390F-Mutation zu kombinieren (vgl. Abb. 3.10).

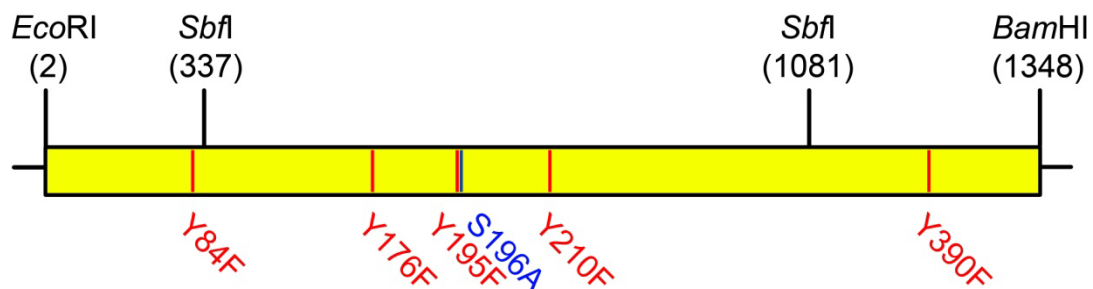


Abbildung 3.10: Konstruktion von pBluescript R3-NPP3-Y84F-Y176F-Y195F-S196A-Y210F-Y390F.

Über *SbfI* können alle Mutationen aus pBluescript R3-NPP3-Y176F-Y195F-S196A-Y210F ungerichtet in pBluescript R3-NPP3-Y84F-Y390F kloniert werden. Das resultierende Konstrukt umfasst alle generierten Mutationen. Die angegebenen Positionen entsprechen den Nukleotidpositionen in PKP3 (vgl. Abb. 3.8).

Der entstandene Vektor wurde pBluescript R3-NPP3-Y84F-Y176F-Y195F-S196A-Y210F-Y390F bezeichnet und mittels Sequenzierung überprüft. Anschließend wurden der mutierte Bereich in den Expressionsvektor pcDNA6 PKP3-CKT3 kloniert.

3.4.4 Konstruktion des pcDNA6 PKP3-CKT3-Vektors mit allen Mutationen

Um den Einfluss der Aminosäure-Mutationen auf das *in vivo* Verhalten von PKP3 zu untersuchen, mussten diese in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA6/V5-His A PKP3-CKT3 kloniert werden. Hierfür wurden zwei aufeinander folgende Klonierungen mit den Restriktionsenzymen *BspEI* und *SbfI* durchgeführt. Der Vektor pBluescript R3-NPP3-Y84F-Y176F-Y195F-S196A-Y210F-Y390F wurde in einem Doppelverdau mit *BspEI* und *SbfI* geschnitten, wodurch drei Fragmente entstanden, von denen zwei für die weiteren Klonierungen benötigt wurden. Einerseits entstand ein *BspEI* / *SbfI*-Fragment mit der Y84F-

Mutation und andererseits ein *SbfI* / *SbfI*-Fragment mit den Mutationen von Y176F bis Y210F. Der Zielvektor pcDNA6 PKP3-CKT3-Y390F wurde ebenfalls mit beiden Restriktionsenzymen geschnitten und in zwei unabhängigen Ligationen mit den beiden pBluescript-Fragmenten ligiert. Der resultierende Vektor wurde pcDNA6 PKP3-CKT3-Y84F-Y390F bezeichnet. Die richtige Orientierung des *SbfI*-Inserts wurde durch Kontrollspaltungen mit *EcoRI*, *BglII* und *BmgBI* sichergestellt. Das Klonierungsschema ist in Abbildung 3.11 nochmals verdeutlicht.

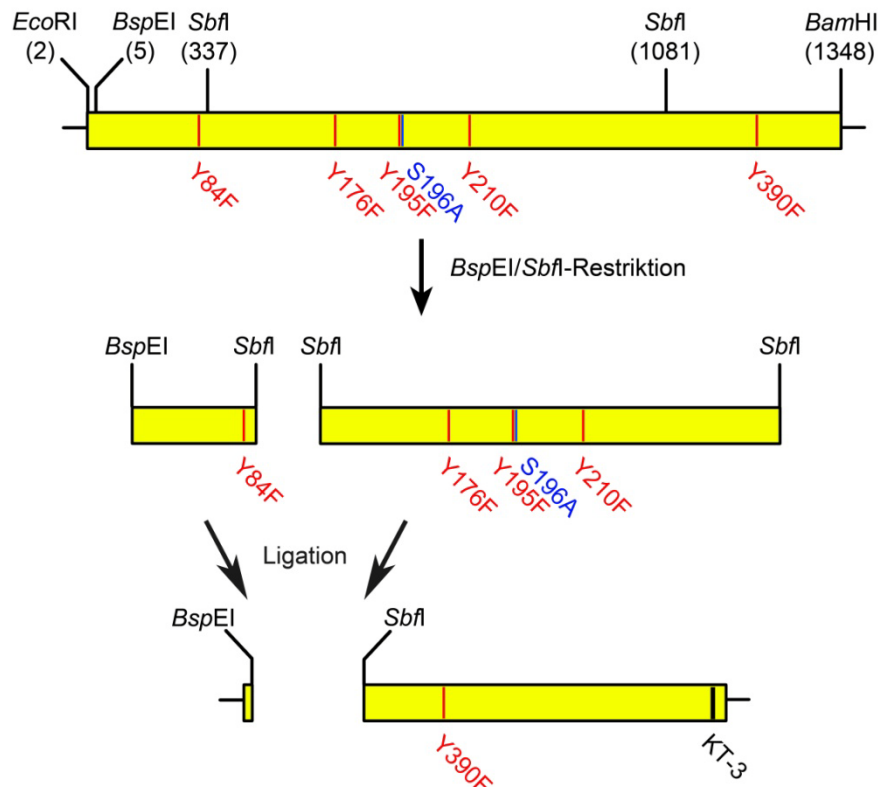


Abbildung 3.11: Konstruktion von pcDNA6 PKP3-CKT3-Y184F-Y390F.

Die parallele Restriktion des pBluescript-Konstruktes mit *BspEI* und *SbfI* führt zur Verteilung der Mutationen auf zwei Fragmente. Diese können durch zwei aufeinander folgende Ligationen mit pcDNA6 PKP3-CKT3-Y390F vervollständigt werden und ermöglichen die Herstellung des kompletten Mutationskonstruktes. Der schwarz dargestellte KT3-Tag am PKP3-Ende im Vektor pcDNA6 ermöglicht die spezifische Detektion des rekombinanten Konstruktes.

Alle beschriebenen pcDNA6/V5-His A PKP3-CKT3-Konstrukte wurden für die Herstellung stabil transfizierter Zelllinien verwendet.

3.5 Herstellung stabiler Linien

Zum Studium der eingefügten Tyrosin-Mutationen in PKP3 wurden stabil mit den Konstrukten transfizierte Zelllinien generiert. Für die Experimente wurde bewusst auf die Verwendung transient transfizierter Zellen verzichtet, um für mehrere Versuchsabläufe und unterschiedliche Experimente möglichst homogene Proben zu garantieren.

Alle Tyrosin-Mutationen im Vektor pcDNA6/V5-His A PKP3-CKT3 (siehe Abschn. 3.4) wurden zur Herstellung stabil transfizierter Klone der Zelllinie A431 verwendet. Diese Zellen wurden sowohl für die Untersuchung des Extraktionsverhaltens von PKP3 als auch für Immunfluoreszenz-Färbungen genutzt. Da A431-Zellen PKP3 exprimieren, wurde bei der Detektion des rekombinanten PKP3s der C-terminale KT3-Tag genutzt, der die Unterscheidung vom zelleigenen PKP3 ermöglichte. Nach der Transfektion konnten positive Zellen durch das Antibiotikum Blasticidin S selektiert werden, welches in einer Endkonzentration von 5 µg/ml zugegeben wurde. Zur Kontrolle der hergestellten Zelllinien wurden Gesamtproteinextrakte in einem 10%-igem SDS-Gel getrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Die Expression wurde immunbiochemisch mit KT3- und PKP3-spezifischen Antikörpern nachgewiesen und ist in Abbildung 3.12 dargestellt.

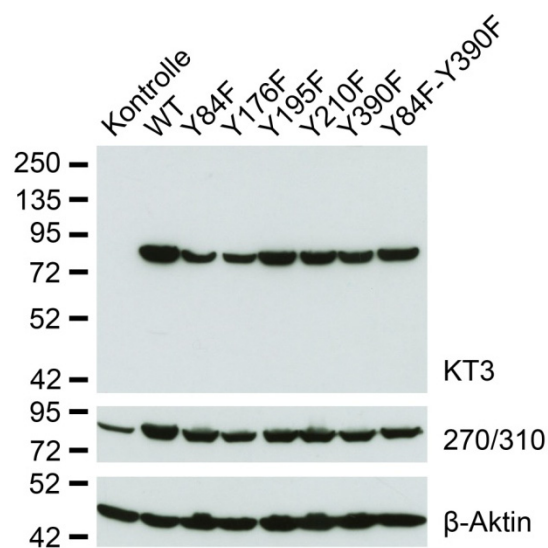


Abbildung 3.12: Analyse der PKP3-Expression in stabil transfizierter A431-Klone.

Gesamtproteinextraktionen stabil transfizierter A431-Zellen wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit KT3-spezifischen Antikörpern auf die Expression von rekombinantem PKP3 untersucht. Die ~87 kDa Bande entspricht dem Molekulargewicht von PKP3 und trat nur in transfizierten A431-Zellen auf. Monoklonale PKP3-Antikörper (270/310) detektierten PKP3 bei ~87 kDa, welches auch in untransfizierte A431-Zellen nachweisbar war (Kontrolle). Als Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung mit Protein wurde Aktin nachgewiesen. Größenangaben in kDa.

Die Expression der rekombinanten PKP3-Konstrukte konnte in allen stabil transfizierten A431-Klonen mit einem monoklonalen Antikörper gegen den KT3-Tag nachgewiesen werden. Die variierende Signalstärke konnte am ehesten auf unterschiedliche

Expressionsraten zurückgeführt werden. Untransfizierte A431-Zellen dienten als Kontrolle und bewiesen die endogene Expression von PKP3, welches mit monoklonalen PKP3 Antikörpern (270/310) detektiert wurde. Der KT3-Antikörper zeigt in dieser Kontrolle keine Signale. Die Mutation des Serin-Restes S196A wurde ebenfalls zur Herstellung eines stabilen A431-Klons verwendet, ist hier allerdings nicht gezeigt.

Für die Charakterisierung der polyklonalen, Phosphorylierungs-spezifischen Antikörper (siehe Abschn. 3.7.4) wurden PLC-Zellen mit ausgewählten Konstrukten stabil transfiziert. PLC-Zellen sind PKP3 negativ und eignen sich daher besonders für den Nachweis exogen eingeführten PKP3, da sie nach Transfektion ausschließlich die rekombinante Variante von PKP3 exprimieren. Mit Hilfe der PKP3-Tyrosin-Mutanten konnten so die korrespondierenden, polyklonalen Antikörper auf die Detektion der spezifischen Tyrosin-Phosphorylierung untersucht werden. Ebenfalls wurde auf eine mit dem PKP3-Wildtyp stabil transfizierte PLC-Zelllinie zurückgegriffen (zur Verfügung gestellt von Viktoria Wischmann). Darüber hinaus wurden PLC-Zellen mit den Konstrukten der Y195F- und Y210F-Mutation stabil transfiziert. Für die Transfektionen fand die Selektion ebenfalls mit Blasticidin S statt, jedoch wurde mit einer Endkonzentration von 7,5 µg/ml gearbeitet. Die Expressionskontrolle erfolgte durch immunbiochemische Analyse der Gesamtproteinextrakte. Für die spezifische Detektion von PKP3 wurde der polyklonale PKP3-Antikörper (P3-3) verwendet. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt (vgl. Abb. 3.13).

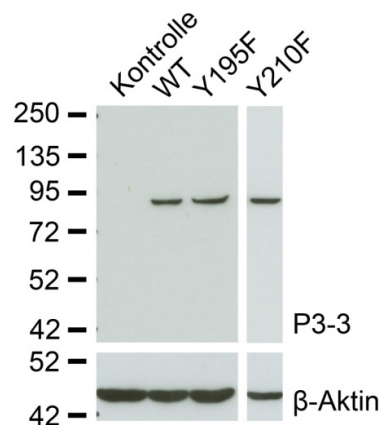


Abbildung 3.13: PKP3-Expressionskontrolle stabil transfizierter PLC-Klone.

PLC-Zellen wurden mit verschiedenen PKP3-Konstrukten transfiziert, welche durch Antibiotika-Selektion generiert wurden. Die Expression von PKP3 wurde mit polyklonalen Antikörpern (P3-3) nachgewiesen, wobei ein Protein von ~87 kDa detektiert wurde. In untransfizierten PLC-Zellen ließ sich kein PKP3 zeigen (Kontrolle). Als Ladekontrolle der Proteinmenge wurde Aktin nachgewiesen. Alle angegebenen Werte in kDa.

Die Expression der transfizierten Plakophilin 3-Varianten konnte in allen hergestellten Zelllinien nachgewiesen werden. Der polyklonale Antikörper P3-3 detektiert PKP3 spezifisch

bei ~87 kDa. Lediglich untransfizierte PLC-Wildtyp-Zellen weisen keine PKP3-Expression auf.

3.6 Analyse der PKP3-Phospho-Tyrosin-Mutanten

Studien an Plakoglobin haben gezeigt, dass Tyrosin-Phosphorylierungen einen Einfluss auf die Assoziation mit anderen desmosomalen Proteinen und die subzelluläre Verteilung haben können [Gaudry *et al.*, 2001]. Ob dies ebenfalls für die Tyrosin-mutierten PKP3-Proteine der Fall ist, sollte in Analysen der entsprechenden Tyrosin-Mutationen mit Hilfe der differentiellen Proteinextraktion und durch Immunfluoreszenz-Färbungen geklärt werden.

3.6.1 Einfluss der Tyrosin-Mutationen auf das Löslichkeitsverhalten von PKP3

Mit Hilfe einer differentiellen Extraktion sollten erste Indizien gesammelt werden, inwieweit die Tyrosin-Reste *per se*, deren spezifischer Austausch gegen Phenylalanin oder eine mögliche fehlende Phosphorylierung das Löslichkeits-Verhalten von PKP3 beeinflussen. Zu diesem Zweck wurden die Proteine aller stabil transfizierter A431-Klone differentiell extrahiert und die löslichen und unlöslichen Proteine auf einem SDS-Gel separiert. Im Western Blot wurden die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und immunbiochemisch mit dem monoklonalen Antikörper gegen den KT3-Tag (KT3) und polyklonalen Antikörpern gegen PKP3 (P3-3) untersucht. Das entsprechende Ergebnis des Immunoblots ist in Abbildung 3.14 dargestellt.

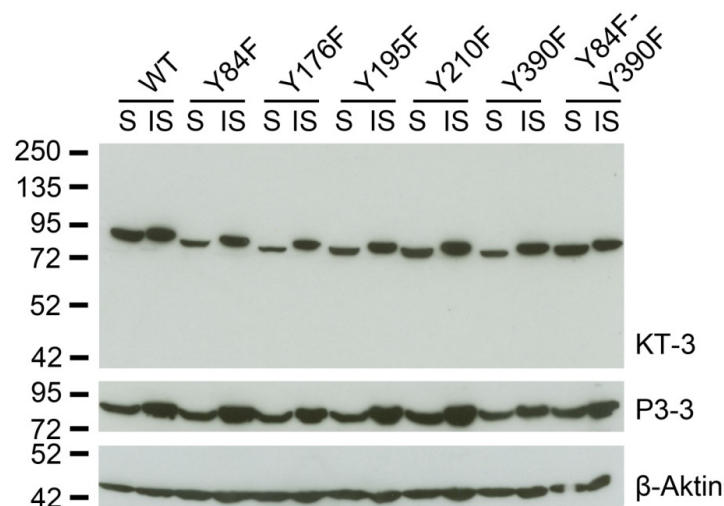


Abbildung 3.14: Extraktionsverhalten der mutierten PKP3-Varianten aus A431-Zellen.

Die Proteine aller stabil transfizierten A431-Zellen wurden differentiell extrahiert und die löslichen (S) und unlöslichen Fraktionen (IS) wurden in einem 10%-igem SDS-Gel aufgetrennt. Rekombinantes PKP3 wurde mit dem monoklonalen Antikörper gegen den KT3-Tag detektiert. Endogenes und exogenes PKP3 konnte mit polyklonalen Antikörpern (P3-3) gezeigt werden. Die Homogenität der Probenauftragung wurde durch die Hybridisierung mit einem Antikörper gegen β -Aktin gewährleistet. Alle Größenangaben in Kilodalton (kDa).

In beiden Fraktionen der differentiellen Extraktion konnte PKP3 bei einem Molekulargewicht von ~87 kDa nachgewiesen werden (P3-3). In den meisten löslichen Fraktionen wurde ein geringerer Anteil an PKP3 detektiert, der sich aus dem methodischen Ablauf des Versuchs ergab (vgl. Abschn. 2.13.3). Die Vergleichbarkeit und die Homogenität der Probenauftragung wurde durch die gleichbleibende Intensität der β -Aktin Hybridisierung gesichert. Die spezifische Detektion der exogen eingebrachten PKP3-Varianten wurde mittels des KT3-Tag ermöglicht (KT3). Lediglich bei den mit dem Wildtyp-PKP3 und dem mit allen Mutationen tragenden PKP3 transfizierten Zellen scheint eine leichte Verschiebung in den löslichen Anteil nachweisbar, sodass etwa gleichstarke Anteile im löslichen und unlöslichen Proteinanteil vorkommen. Das PKP3-Extraktionsverhalten der anderen Tyrosin-Mutanten unterscheidet sich nicht vom endogenen PKP3. Die Extraktion der Serin-Mutation an Aminosäure 196 wurde in diesem Versuch nicht untersucht, korrelierte allerdings mit den dargestellten Ergebnissen der Tyrosin-Mutanten. Die leichten Laufunterschiede zwischen den löslichen und unlöslichen Fraktionen sind vermutlich auf unterschiedliche Ionenkonzentrationen in den Proben zurückzuführen.

In Abschnitt 3.2 konnte gezeigt werden, dass PKP3 in normalen Zellen nur in geringem Maße phosphoryliert vorliegt und ein Nachweis der Tyrosin-Phosphorylierung durch die Behandlung mit dem Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor Pervanadat erreicht wurde. Daher wurden die transfizierten A431-Zellen vor der differentiellen Extraktion mit Pervanadat behandelt. Die weiteren Schritte des Experiments wurden äquivalent durchgeführt und das Ergebnis der Western Blot Hybridisierung ist in folgender Abbildung 3.15 dargestellt.

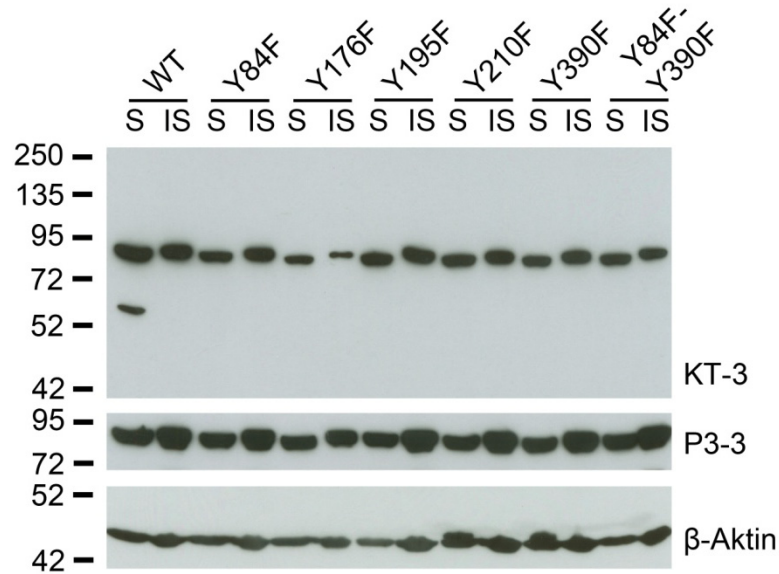


Abbildung 3.15: Extraktionsverhalten der rekombinanten PKP3-Varianten nach Pervanadat-Behandlung.

Stabil transfizierte A431-Zellen wurden für 15 Minuten mit 0,1 mM Pervanadat behandelt und für eine differentielle Extraktion verwendet. Die löslichen (S) und unlöslichen Fraktionen (IS) wurden auf einem 10%-igem SDS-Gel separiert und auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Die Hybridisierung mit dem monoklonalen Antikörper gegen den KT3-Tag ermöglichte die Detektion mutierten PKP3. PKP3 wurde mit polyklonalen Antikörpern gegen PKP3 (P3-3) detektiert. Die Homogenität der Probenauflagerung wurde durch die Hybridisierung mit einem Antikörper gegen β -Aktin untersucht. Alle Größenangaben in Kilodalton (kDa).

Das Extraktionsverhalten von endogenem PKP3 wurde durch Pervanadat-Behandlung und der damit zusammenhängenden Zunahme an Tyrosin-Phosphorylierungen minimal verändert (P3-3). Endogenes PKP3 wurde nach wie vor in beiden Fraktionen mit unterschiedlicher Intensität nachgewiesen, jedoch schien der Anteil von PKP3 in der löslichen Fraktion im Vergleich zu unbehandelten Zellen etwas höher. Rekombinantes PKP3 wurde mit dem monoklonalen KT3-Antikörper detektiert und zeigte in Abhängigkeit von Pervanadat ebenfalls eine Verschiebung hin zu löslicheren Proteinen, also eine homogenere Mengenverteilung zwischen beiden Fraktionen. Im Unterschied zu den in unbehandelten A431-Zellen gefundenen, meist deutlichen Unterschieden, war die Stärke der Detektionssignale in löslicher und unlöslicher Fraktion nun nahezu identisch (vgl. Abb. 3.14). Der Vergleich der rPKP3-Varianten untereinander ergab dennoch eine homogene Extraktion, die, bis auf die Mutation an Y176, keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Tyrosin-Mutanten offenbarte. Da die Ergebnisse für die Mutation an Tyrosin Y176 nach Wiederholung des Experiments nicht reproduziert werden konnten, handelte es sich womöglich um ein Detektions-Artefakt. Unter dem Einfluss von Pervanadat zeigte das Extraktionsverhalten der rPKP3-Variante mit der Mutation an Serin 196 ebenfalls keine Unterschiede.

3.6.2 Einfluss der Tyrosin-Mutationen auf die subzelluläre Verteilung von PKP3

Da die erzeugten Tyrosin- und Serin-Mutationen zu keiner deutlichen Veränderung des Extraktionsverhaltens führten, wurde der Einfluss der Mutationen auf die subzelluläre Verteilung mittels Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen untersucht. Hierfür wurden die A431-Klone auf Deckgläschen angezogen und mit Methanol / Aceton fixiert. Die mutierten PKP3-Varianten wurden mit dem monoklonalen Antikörper gegen den KT3-Tag detektiert. PKP3 wurde mit polyklonalen Antikörpern (P3-3) nachgewiesen, die sowohl endogenes als auch exogenes PKP3 erkannten. Alle Klone wurden in der Fluoreszenzmikroskopie analysiert und dokumentiert. In der nachfolgenden Abbildung werden die Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen von zwei ausgewählten Mutanten exemplarisch dargestellt. Die Ergebnisse der anderen Zelllinien mit mutiertem PKP3 waren vergleichbar.

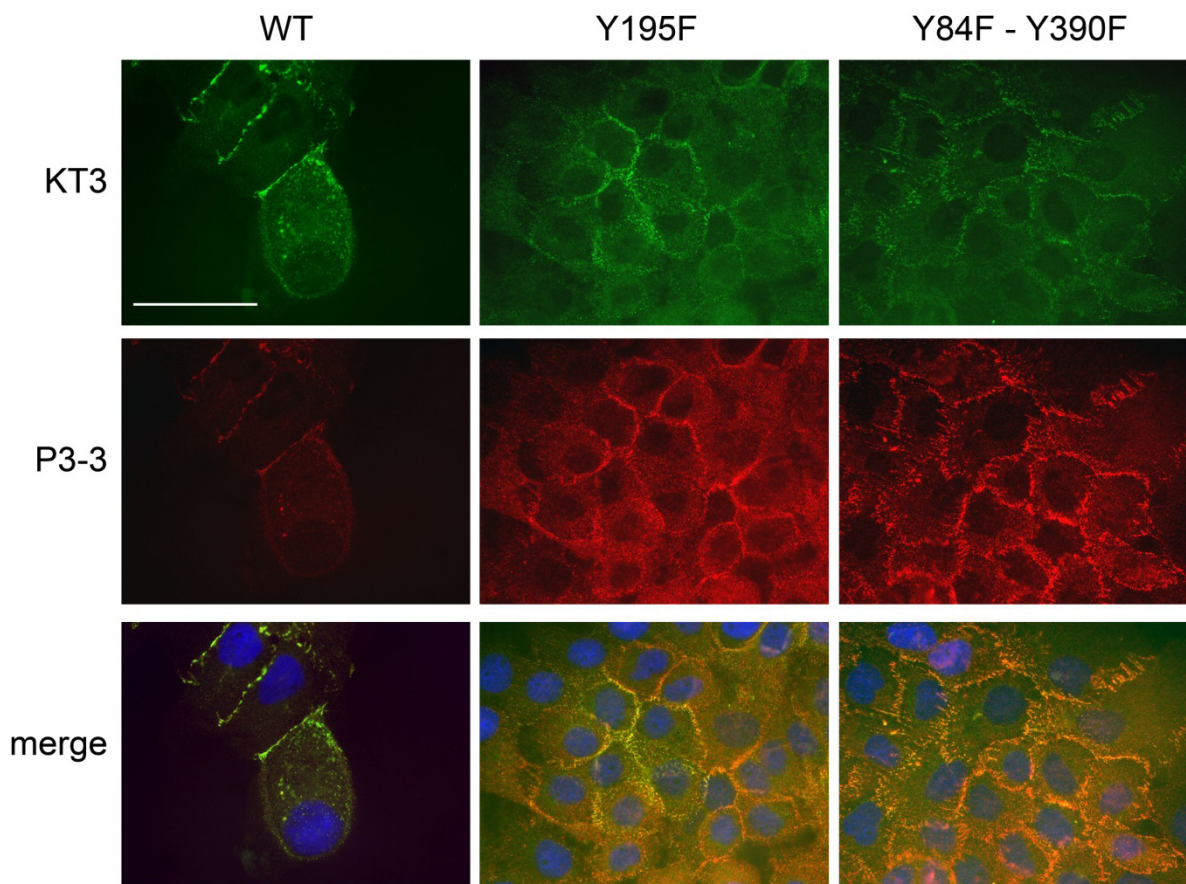


Abbildung 3.16: Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen von PKP3 in transfizierten A431-Zellen.

Transfizierte A431-Zellen exprimierten eine rekombinante PKP3-Variante (hier WT, Y195F oder Y84F – Y390F) die mit dem monoklonalen Antikörper gegen den KT3-Tag detektiert wurde (KT3; grüner Kanal). PKP3 wurde mit polyklonalen Antikörpern (P3-3; roter Kanal) nachgewiesen. Die Überlagerung beider Kanäle ist in den untersten Tafeln dargestellt (merge). Größenstandard: 20µm

Die Fluoreszenz-Färbung des rPKP3-WTs mit dem KT3-Antikörper zeigte ein desmosomales Muster im Bereich der Zellgrenzen, welches von einer leichten zytoplasmatischen Färbung mit einzelnen stärkeren Granula begleitet wurde. Die Kontrollfärbung mit dem polyklonalen

PKP3-Antikörper (P3-3) zeigte ein identisches Detektionsmuster, was durch Überlagerung beider Kanäle bekräftigt wurde. Im Zellkern wurde keine Färbung detektiert. Der mögliche Effekt der Tyrosin-Mutationen auf die subzelluläre Verteilung von PKP3 wurde anhand zweier Mutanten gezeigt. Weder die Y195F-Mutation noch die Kombinationsmutante, welche alle generierten PKP3-Mutationen vereinigte, deuteten auf eine Veränderung der PKP3-Lokalisation hin. Beide mutanten Proteine wurden mittels des KT3-spezifischen Antikörpers vornehmlich in den Zell-Zell-Verbindungen detektiert. Eine intensive zytoplasmatische Färbung wurde ebenfalls beobachtet. Die Gegenfärbung mit dem polyklonalen PKP3-Antikörper zeigte ein gleiches Muster (P3-3). Die Färbungen beider Kanäle ließen sich vollständig im Sinne einer gelben Mischfarbe überlagern, wobei keine grünen oder roten Einzelfärbungen zurückblieben (merge). Färbungen des Zellkerns traten nicht auf. Keine der erzeugten PKP3-Mutationen führte gegenüber nativem PKP3 zu einem veränderten Lokalisationsverhalten in A431-Zellen.

3.7 Herstellung Phospho-Tyrosin-spezifischer Antikörper

3.7.1 Herstellung polyklonaler Antiseren

Die in Abschnitt 3.3 beschriebenen Tyrosin-Phosphorylierungen sollten in weiteren Experimenten genauer analysiert werden. Hierfür wurden zunächst Tyrosin-spezifische Antikörper hergestellt, mit deren Hilfe die Phosphorylierung der entsprechenden Aminosäure gezielt detektiert werden konnte. Für das Design der Antigene wurde auf die Proteinsequenz von PKP3 zurückgegriffen, und für jede zu untersuchende Tyrosin-Phosphorylierung wurde ein 12mer Oligopeptid synthetisiert (PSL, Heidelberg). Das phosphorylierte Tyrosin wurde zentral in den Peptidsequenzen positioniert. Die fünf Phospho-Tyrosin-Peptide und das Phospho-Serin-Peptid sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst. Das Cystein am N-terminalen Ende wurde künstlich angefügt, um die Peptide koppeln zu können.

Tabelle 3.4: Oligopeptide zur Herstellung Phospho-Tyrosin-spezifischer Antikörper.

PKP3 Tyrosin-Position	Peptid-Sequenz
p-Y84 = Phospho-Tyrosin Y84	N – CTSRGQY(p)HTLQA – C
p-Y176 = Phospho-Tyrosin Y176	N – CGSRADY(p)DTLSL – C
p-Y195 = Phospho-Tyrosin Y195	N – CGLDDRY(p)SLVSE – C
p-S196 = Phospho-Serin S196	N – CLDDRY(p)LVSEQ – C
p-Y210 = Phospho-Tyrosin Y210	N – CAATSTY(p)RAFAY – C
p-Y390 = Phospho-Tyrosin Y390	N – CMRNLIY(p)DNADN – C

Für die Immunisierung von weißen neuseeländischen Kaninchen wurde KLH-gekoppeltes Phospho-Peptid verwendet. Die Fusion der Peptide mit dem Hämazytin der Großen Kalifornischen Schlüssellochnapfschnecke diente der Stimulation einer Immunantwort [Harlow, 1988]. Die Immunisierungen wurden parallel in zwei Versuchstieren je Peptid durchgeführt und in regelmäßigen Abständen wurde den Tieren Testblut entnommen, welches im Western Blot auf die Reaktivität gegenüber dem Antigen getestet wurde. Zur immunbiochemischen Untersuchung der Antigen-Reaktion an Nitrozellulose-Membranen wurden die Phospho-Peptide an BSA gebunden, wodurch eine Auftrennung mittels eines SDS-Gels möglich war. Die Analyse des Testblutes zeigte gegen das Y176- und das S196-Antigen in beiden Tieren keine Reaktion, weshalb diese für die weiteren Experimente nicht zur Verfügung standen. Die Immunantworten gegen die verbleibenden Antigene waren moderat bis gut, so dass diese Antiseren weiter charakterisiert werden konnten.

3.7.2 Aufreinigungsschema polyklonaler Antiseren

Die Aufreinigung polyklonaler Seren war ein entscheidender Schritt zur Gewinnung eines Phosphorylierungs-spezifischen Antikörpers. Dabei war es notwendig, die möglichen Antikörper-Antigen-Reaktionen zu kennen, um das Aufreinigungsschema den Anforderungen entsprechend anzupassen. Die Immunantwort konnte vier mögliche Antikörper-Reaktionen auf das phosphorylierte Peptid generieren. Einerseits kamen Phosphorylierungs-unabhängige Antikörper vor, die entweder die unphosphorylierte Phospho-Aminosäure (Dephospho-spezifisch) erkannten oder an anderer Stelle innerhalb des Peptids banden (Pan-spezifisch). Andererseits existierten Phosphorylierungs-abhängige Antikörper, die spezifisch die Phospho-Aminosäure im Kontext des Peptids detektierten (Phospho-Site-spezifisch) oder ausschließlich mit der Phosphorylierung reagierten (Phospho-spezifisch). Alle dargestellten Möglichkeiten sind in Abbildung 3.17 nochmals veranschaulicht.

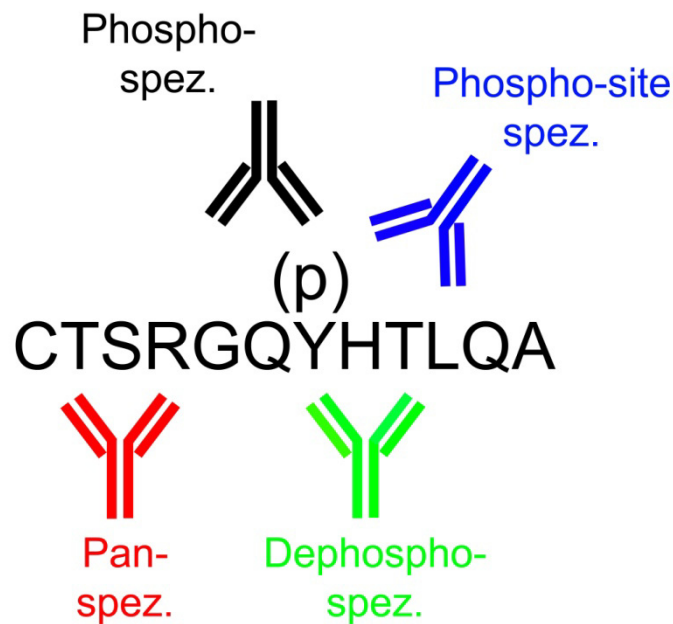


Abbildung 3.17: Schema von möglichen Antikörper-Immunantworten auf ein Phospho-Peptid.

Die immunologische Reaktion konnte vier mögliche Antikörper mit spezifischen Erkennungsmerkmalen bilden. Phosphorylierungs-unabhängige Antikörper, wie die Pan- und Dephospho-spezifische Variante (rot, grün) und Phosphorylierungs-abhängige Antikörper, wie die Phospho-Site- und Phospho-spezifische Variante (blau, schwarz).

Entsprechend wurden die polyklonalen Seren in zwei Schritten mittels Affinitätschromatographie mit Hilfe des SulfoLink Immobilization Kit for Peptides aufgereinigt. Im ersten Aufreinigungsschritt wurden die Pan- und Dephospho-spezifischen Antikörper aus dem Antiserum abgereinigt. Hierfür wurde das unphosphorylierte Peptid an die Säule gekoppelt und das Antiserum zugegeben. Nach einstündiger Inkubation wurde durch Zentrifugation ein Durchfluss gewonnen, der ausschließlich die Phosphorylierungs-spezifischen Antikörper beinhaltete. Mit einer erneuten Affinitätsaufreinigung am phosphorylierten Peptid konnte aus diesem Durchfluss der Phospho-Site-spezifische Antikörper isoliert werden.

3.7.3 Charakterisierung der aufgereinigten Antiseren an Antigen-Peptiden

Die aufgereinigten Seren wurden zunächst gegen spezifisches und unspezifisches Antigen geprüft. Hierfür wurden auf einem 10%-igem SDS-Gel jeweils 2,5 ng der BSA-gekoppelten Peptide aufgetragen. Dabei wurde auf das gesamte Peptid-Repertoire zurückgegriffen, um ein möglichst breites Antigenspektrum anzubieten. Des Weiteren wurden die Antiseren gegen Tyrosin-phosphoryliertes BSA eingesetzt, um die Seren-Aufreinigung in Hinblick auf die Phospho-Spezifität zu überprüfen. Der Phosphorylierungs-Status wurde auf diesen so genannten Peptid-Blots vor der weiteren Verwendung mit einem monoklonalen Phospho-Tyrosin-Antikörper überprüft und ist in Abbildung 3.18 dargestellt.

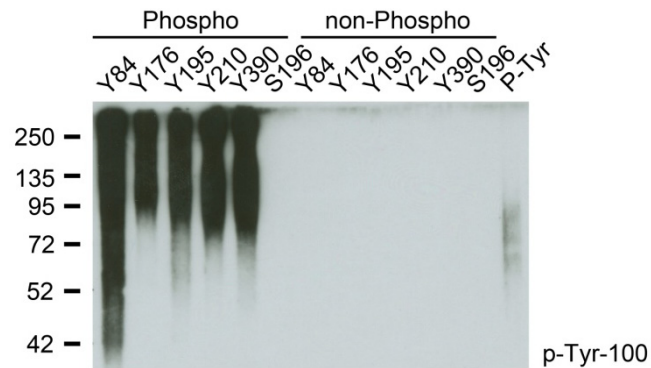


Abbildung 3.18: Nachweis der Tyrosin-Phosphorylierungen auf dem Peptid-Blot.

Die Detektion der Tyrosin-Phosphorylierungen mit dem Phospho-Tyrosin-Antikörper P-Tyr-100 zeigte eine Reaktion ausschließlich mit den Phospho-Tyr-Peptiden und dem Tyr-phosphorylierten BSA (P-Tyr).

Die phosphorylierten Peptide konnten mit dem Phospho-Tyrosin-spezifischen Antikörper detektiert werden (P-Tyr-100). Besondere Beachtung gilt hierbei dem eigentlichen Detektionssignal, denn anstatt einer klar abgegrenzten Bande tritt ein über die ganze Laufspur verteiltes Signal auf. Dieses charakteristische Signal ergibt sich aus der Kopplung der Peptide an Maleimid-aktiviertes BSA. Da bei dieser Methode eine Vielzahl von Peptiden mit unterschiedlichen Kopplungseffizienzen an das BSA-Molekül gebunden werden, können die daraus resultierenden Moleküle verschiedenste Molekulargewichte aufweisen. Die Phosphorylierung an Serin wurde erwartungsgemäß mit diesem Antikörper nicht detektiert, konnte allerdings in vorherigen Experimenten mit Phosphorylierungs-spezifischen Antikörpern bereits bestätigt werden (nicht gezeigt). Unphosphorylierte Proteine wurden nicht detektiert. Tyrosin-phosphoryliertes BSA zeigte lediglich ein schwaches Phosphorylierungs-Signal.

Für die weiteren Experimente mit den individuellen Phospho-spezifischen Seren wurde pro Peptid-Blot lediglich ein Signal erwartet, weshalb die exakte Identifikation der Spuren gewährleistet werden musste. Nach dem Western Blot konnten die Laufspuren mit Ponceau S nicht direkt markiert werden, da die aufgetragenen Proteinmengen sehr gering waren. Aus diesem Grund wurde in jeder Spur zusätzlich 10 ng eines rekombinanten Desmoplakin-Fragments aufgetragen, welches mit einem polyklonalen Desmoplakin-Antikörper bei ~30 kDa detektiert wurde und einen genauen Rückschluss auf die Laufspur und das entsprechende Peptid ermöglichte (Protein und Antikörper wurden von Viktoria Wischmann zur Verfügung gestellt). Das Ergebnis der Western Blot Hybridisierung zur Analyse der Phospho-Antikörper ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

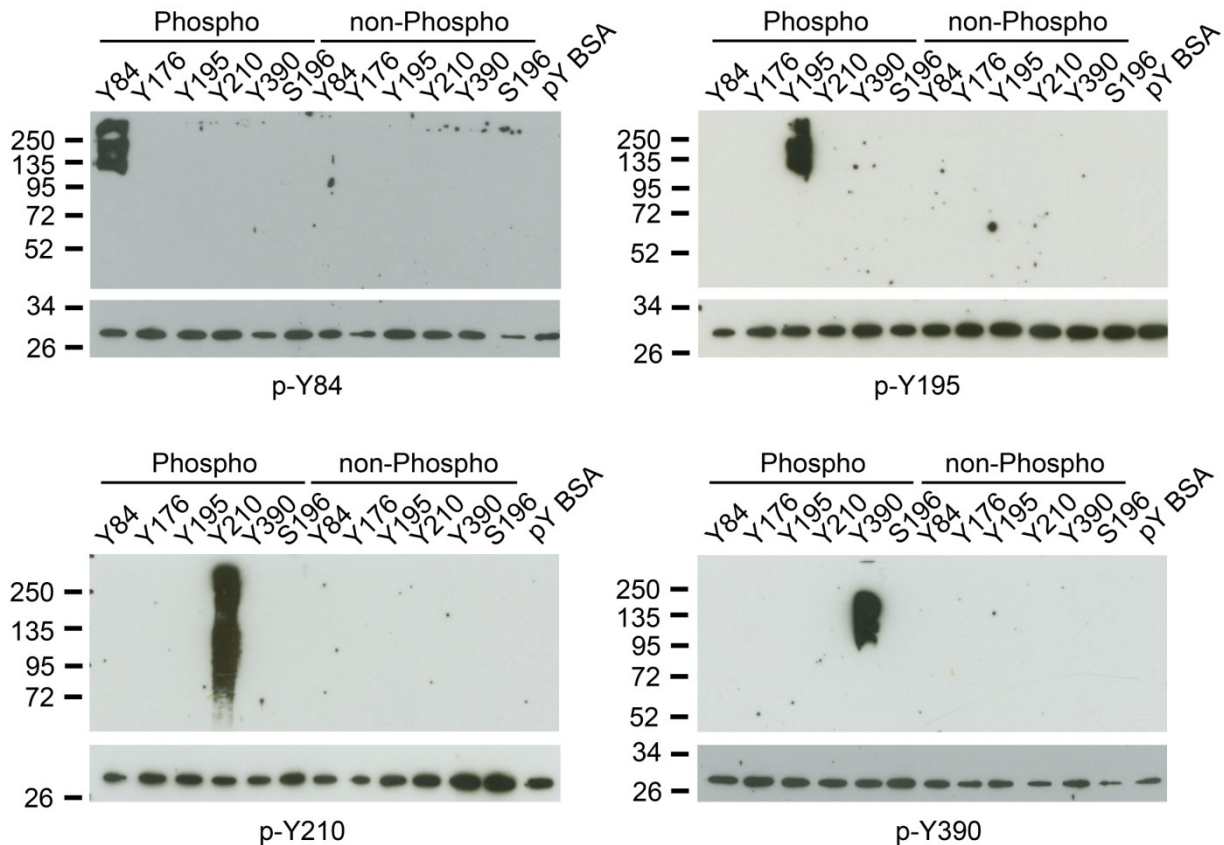


Abbildung 3.19: Charakterisierung der gereinigten PKP3-Phospho-Tyrosin Antikörper an Peptid-Blots.

Die Western Blot Hybridisierung zeigte die Reaktion der aufgereinigten Antiseren an den verschiedenen Peptiden. Zur Spuridentifikation wurde ein rekombinantes Desmoplakin-Fragment aufgetragen, welches mit dem polyklonalen Antikörper DP-1 detektiert werden konnte.

Alle aufgereinigten Seren erkannten ihr spezifisches, phosphoryliertes Antigen. Anhand der Intensität des Detektions-Signals konnten Rückschlüsse auf den jeweiligen Titer der Antikörper gezogen werden. Der p-Y210-Antikörper zeigte das intensivste Signal und hatte Ähnlichkeit mit der Detektion durch den Phospho-Tyrosin-Antikörper (vgl. Abb. 3.18). Kreuzreaktionen mit nicht-phosphoryliertem Peptid oder anderen Peptid-Varianten wurden bei diesem Versuch nicht festgestellt.

Als zusätzliche Kontrolle sollten die polyklonalen Antikörper vor der Hybridisierung mit ihrem spezifischen Phospho-Peptid abgesättigt und blockiert werden. Hierfür wurden die Antikörper in BSA verdünnt und mit 25 ng des korrespondierenden Peptids (BSA-gekoppelt) versetzt. Nach einstündiger Inkubation unter Durchmischung bei Raumtemperatur wurden die prä-adsorbierten Antikörper für die Western Blot Hybridisierung verwendet. Bei der anschließenden Detektion konnten keine Signale registriert werden (nicht gezeigt). Die Präadsorption mit unphosphorylierten Peptiden oder unspezifischen Phospho-Peptiden hatte hingegen keinen Einfluss auf das Detektionssignal (nicht gezeigt).

3.7.4 Charakterisierung der aufgereinigten Antisera an verschiedenen Zelllinien

Im nächsten Schritt wurden die Antikörper auf Gesamtproteinextrakten verschiedener Zelllinien charakterisiert. Bei diesen Experimenten wurde einerseits die Phosphorylierungsabhängige Detektion von PKP3 untersucht und andererseits das Auftreten von Kreuzreaktionen vor dem Hintergrund eines komplexen Proteingemisches. Da die genauen Bedingungen, die zur Phosphorylierung von PKP3 an Tyrosin Y84, Y195, Y210 und Y390 führen, unbekannt waren, wurden sowohl unbehandelte als auch Pervanadat-behandelte Zellen verwendet. Durch den Einsatz des unspezifischen Tyrosin-Phosphatase-Inhibitors Pervanadat wurde PKP3 intensiv phosphoryliert, wodurch möglicherweise auch die untersuchten Tyrosin-Reste betroffen waren (siehe Abschn. 3.2). Für die Experimente wurden behandelte und unbehandelte Gesamtproteinextrakte von A431-, HaCaT-, CaCo2- und PLC-Zellen angefertigt und je nach Anforderung für die SDS-PAGE verwendet.

Im Zuge der Charakterisierung erbrachte lediglich der polyklonale Antikörper gegen Y195-phosphoryliertes PKP3 keine unerwünschten Kreuzreaktionen und wurden demzufolge für die weiteren Untersuchungen bevorzugt. Aus diesem Grund ist im Folgenden ausschließlich dessen Charakterisierung dargestellt. Die Charakterisierungen der Antisera gegen p-Y84, p-Y210 und p-Y390 finden sich im Anhang.

3.7.4.1 Charakterisierung des p-Y195-Antikörpers

Zur Charakterisierung des p-Y195-Antikörpers wurden die Gesamtproteinextrakte unbehandelter und Pervanadat-behandelter Zellen auf ein 10%-iges SDS-Gel aufgeladen und aufgetrennt. Die Proteine wurden per Western Blot auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und mit polyklonalen Antikörpern gegen p-Y195 hybridisiert. Die Antikörper wurden mittels Chemilumineszenz identifiziert und das Ergebnis der Detektion ist in Abbildung 3.20 dargestellt.

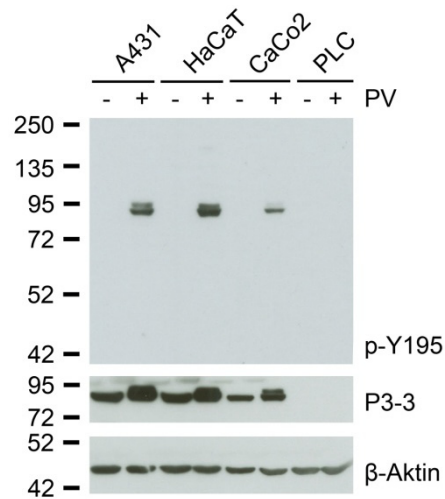


Abbildung 3.20: Immunbiochemische Analyse des p-Y195-Antikörpers.

Gesamtproteinextrakte unbehandelter und Pervanadat-behandelter (PV) A431-, HaCaT-, CaCo2- und PLC-Zellen wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Membran gebロットet. Die Hybridisierung mit dem p-Y195-Antikörper zeigte PKP3 ausschließlich in Pervanadat-behandelten Proben. Die Identität von PKP3 wurde mit einem polyklonalen Antikörper sichergestellt (P3-3). Die auftretenden Doppelbanden charakterisieren die intensive Phosphorylierung von PKP3 infolge der Pervanadat-Behandlung. In PLC-Zellen wurde kein PKP3 detektiert.

Die Phosphorylierung von PKP3 an Y195 ließ sich in unbehandelten Zellen nicht zeigen. Der Phosphorylierungs-abhängige Nachweis von PKP3 gelang nach Behandlung der Zellen mit Pervanadat, wobei der Antikörper auf der Höhe von PKP3 (~87 kDa) zwei Banden zeigte. Diese Doppelbanden wurden ebenfalls von dem polyklonalen PKP3-spezifischen Antikörpern (P3-3) erkannt und leiteten sich womöglich aus der starken Phosphorylierung von PKP3 ab. Die PKP3-defiziente Zelllinie PLC wurde als Negativkontrolle verwendet und zeigte für beide Antikörper kein Signal.

Um die Phosphorylierungs-Spezifität des p-Y195-Antikörpers in dieser experimentellen Anordnung zu verifizieren, wurden behandelte und unbehandelte Gesamtproteinextrakte erneut auf einem 10%-igem SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran gebロットet. Die Membran wurde über Nacht mit der Protein-Phosphatase CIP (calf intestine phosphatase) bei 37 °C inkubiert, wodurch die gebunden Proteine dephosphoryliert wurden. Die anschließende Western Blot Hybridisierung mit den p-Y195-Antikörpern zeigte keine Signale und bestätigte die Phosphorylierungs-Spezifität der p-Y195-Antikörper (nicht gezeigt).

3.7.4.2 Nachweis der Phospho-Tyrosin-Spezifität des p-Y195-Antikörpers an PKP3-transfizierten PLC-Zellen

Die PKP3-transfizierten PLC-Zellen konnten dazu verwendet werden, die Spezifität der p-Y195-Antikörper hinsichtlich der Phosphorylierung am Tyrosin-Rest Y195 zu testen. Zur Charakterisierung wurden transfizierte PLC-Zellen (PKP3-Wildtyp und PKP3-Y195F-Mutation) mit dem Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor Pervanadat behandelt und die Gesamtproteinextrakte auf einem 10%-igem SDS-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und immunbiochemisch mit den p-Y195-Antikörpern detektiert. In der folgenden Abbildung 3.21 ist das Ergebnis der Western Blot Hybridisierung dargestellt.

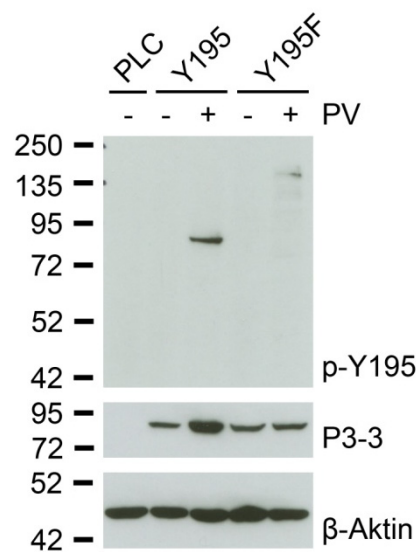


Abbildung 3.21: Immunbiochemische Analyse der Phospho-Tyrosin-Spezifität des p-Y195-Antikörpers.

Unbehandelte oder Pervanadat-behandelte (PV) Gesamtproteinextrakte aus den stabil transfizierten PLC-Zellen (PKP3-WT [Y195] und PKP3-Y195F [Y195F]), sowie untransfizierte PLC-Zellen wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Die Hybridisierung mit p-Y195-Antikörpern zeigte lediglich in PKP3-WT transfizierten PLC-Zellen und nach Pervanadat-Behandlung ein Signal bei 87 kDa, welches mit monoklonalen Antikörpern gegen PKP3 identifiziert wurde (270/310). Die Homogenität der Probenaufrichtung wird durch die Hybridisierung von β -Aktin kontrolliert. Alle Größenangaben in Kilodalton (kDa).

P-Y195-Antikörper detektieren PKP3 bei 87 kDa ausschließlich in PKP3-WT exprimierenden PLC-Zellen und nach Pervanadat-Behandlung. Die Aminosäure-Substitution des Tyrosins nach Phenylalanin führte zum Verlust der Reaktivität und unterstreicht die Phospho-Spezifität des generierten Antikörpers auf diesen Tyrosin-Rest (siehe Y195F in Abb. 3.21). Die Expression von PKP3 in den Zellen wurde durch die polyklonale Antikörper gegen PKP3 untersucht (P3-3).

3.8 Analyse der PKP3-Phosphorylierung an Tyrosin Y195

Im weiteren Verlauf der Arbeit stand die Charakterisierung der Tyrosin-Phosphorylierung an Position 195 von PKP3 im Mittelpunkt. Die systematische Manipulation der Zellen sollte Hinweise darauf geben, unter welchen Bedingungen die Phosphorylierung auftritt und durch welche Kinasen diese katalysiert wird. Da bisher keine Phosphorylierungen an Plakophilin 3 beschrieben wurden und die zellulären Umstände, die zur Phosphorylierung führen, unbekannt sind, wurden zunächst Ansätze gewählt, die bei anderen desmosomalen Proteinen bereits zu Veränderungen der posttranslationalen Modifikationen führten. Eukaryotische Zellkulturen wurden hierfür mit externen Stimuli gezielt induziert und auf die Phosphorylierung von Y195 untersucht.

3.8.1 Stimulation mit dem Epidermalen Wachstumsfaktor EGF

Der epidermale Wachstumsfaktor EGF fungiert als zelluläres Signalmolekül, welches bei der Zelldifferenzierung und der Einleitung der Mitose gebildet wird. EGF ist ein 53 Aminosäuren zählendes Peptid, bindet an den EGF-Rezeptor und führt zu dessen Aktivierung. Der EGF-Rezeptor ist eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase und initiiert eine Vielzahl zellulärer Signalkaskaden [Oda *et al.*, 2005].

Für die EGF-Stimulation wurden A431-, HaCaT- und CaCo2-Zellen mit 10 ng/ml rekombinantem EGF behandelt. 24 Stunden vor der Stimulation wurden das Komplettmedium der Zellen durch Serum-freies Medium ersetzt, um einerseits die autokrine EGF-Sekretion und andererseits Wachstumsfaktoren, die im Serum enthalten sind zu entziehen. Durch dieses „Hungern“ der Zellen wird die Phosphorylierung der intrazellulären Signalmoleküle reduziert. Als Stimulationskontrolle wurden die MAP-Kinasen 42 und 44 (i.e. ERK1 / 2) ausgewählt. Diese sind *downstream*-Mediatoren des EGF-Rezeptors und deren Aktivierung kann mit einem Phosphorylierungs-spezifischen Antikörper gegen ERK1 / 2 gezeigt werden [Mizuno *et al.*, 2006]. Die Zellen wurden für 5, 10, 20, 30 und 45 Minuten mit EGF behandelt und anschließend zur Präparation eines Gesamtproteinextraktes verwendet. Die Proteine wurden auf einem 10%-igem SDS-Gel getrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die immunbiochemische Analyse der Extrakte mit p-Y195-Antikörpern zeigte in allen verwendeten Zelllinien kein PKP3-Signal. Die Hybridisierung mit Kontroll-Antikörpern gegen PKP3 (P3-3), phospho-ERK1/2 (p-ERK1/2) und β -Aktin ist in Abbildung 3.22 für alle verwendeten Zelllinien dargestellt.

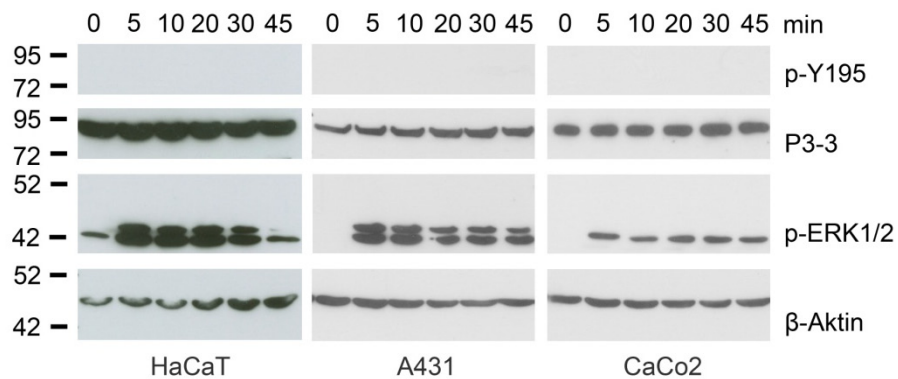


Abbildung 3.22: Immunbiochemische Analysen von EGF-behandelten HaCaT-, A431- und CaCo2-Zellen.

Gesamtproteinextrakte wurden nach den angegebenen Zeiten der EGF-Stimulation erstellt, und auf einem SDS-Gel separiert, auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und mit verschiedenen Antikörpern hybridisiert. PKP3 wird bei 87 kDa detektiert (P3-3). Die Stimulation-Kontrolle zeigte bei 42 und 44 kDa die Aktivierung von ERK1 / 2 (p-ERK1/2). Die Phosphorylierung von PKP3 an Y195 konnte in vier parallelen Ansätzen nicht detektiert werden. Größenmarker in Kilodalton (kDa).

Die Stimulation der Zellen konnte nach EGF-Zugabe mit einem monoklonalen Antikörper gegen die ERK1 / 2 (p-ERK1/2) gezeigt werden. Bereits fünf Minuten nach der Zugabe des Wachstumsfaktors wurde eine deutliche Zunahme des Signals beobachtet. Dieser sprunghafte Anstieg konnte in allen Zelllinien reproduziert werden. Nach 45 Minuten nahm die Stimulation der HaCaT- und A431-Zellen wieder ab, was dem biphasischen Aktivierungsverlauf von ERK1 / 2 entspricht, welcher bereits kurze Zeit nach Mitogengabe stark ansteigt (Maximum nach etwa 10 min) und dann für die gesamte G1-Phase auf einem niedrigeren, aber weiterhin aktiven Niveau verharrt [Meloche *et al.*, 1992]. Bei CaCo2-Zellen konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Da eine Wirkung auf die Signalmoleküle bereits nach kurzer Zeit der EGF-Stimulation zu beobachten ist, wurde auf eine längere Stimulationszeit verzichtet.

Da nach Gesamtproteinextraktion EGF-behandelter Zellen kein Y195-phosphoryliertes PKP3 nachweisbar war, sollte PKP3 nach der EGF-Behandlung gezielt präzipitiert werden, um sicher zustellen, dass die entsprechende Aktivierung nicht durch Ausdünnung in einem Gesamtproteinextrakt übersehen wurde. Hierfür wurde von EGF-behandelten HaCaT-Zellen ein löslicher Proteinextrakt hergestellt, der für eine Immunpräzipitation mit dem monoklonalen PKP3-Antikörper Klon 23E3/4 verwendet wurde. Die einzelnen Fraktionen wurden auf einem 10%-igem SDS-Gel separiert und im Western Blot auf eine Membran übertragen. Die Präzipitation wurde immunbiochemisch mit dem polyklonalen Antikörper gegen PKP3 kontrolliert (P3-3) und auf die Phosphorylierung des Tyrosins überprüft (p-Y195). Die Phosphorylierung von PKP3 an Y195 konnte nicht gezeigt werden und bestätigte die vorangegangenen Ergebnisse an EGF-behandelten Gesamtproteinextrakten. Der Versuch

wurde mit löslichen Proteinextrakten EGF-behandelter A431-Zellen wiederholt und führte zum gleichen Resultat (nicht gezeigt).

3.8.2 Stimulation mit dem Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor IGF-1

IGF-1 ist ein Wachstumsfaktor, der hohe strukturelle Ähnlichkeit mit Insulin hat und von der Leber gebildet wird. Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren sind bei zellulären Wachstums- und Differenzierungsprozessen beteiligt und wirken auf viele Zell- und Gewebstypen. IGF-1 ist ein 70 aa Peptid und bindet an den Membran-ständigen IGF-Rezeptor. Dessen Aktivierung führt *downstream* ebenfalls zur Phosphorylierung von ERK1 / 2, weshalb diese erneut als Kontrolle der Stimulation verwendet wurden [Zhang *et al.*, 1999]. Für die IGF-1-Stimulation wurden die A431-, HaCaT- und CaCo2-Zellen 24 Stunden vor der Behandlung mit Serum-freiem Medium gefüttert und anschließend mit 5 ng/ml rIGF-1 für 10, 20, 30 und 45 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Gesamtproteine extrahiert und für eine SDS-PAGE verwendet. Nach dem Western Blot wurde die Membran mit Antikörpern gegen p-Y195 und mit den bereits erwähnten Kontrollantikörpern hybridisiert. Ein Phosphorylierungs-spezifisches PKP3-Signal an Y195 konnte nach IGF-1-Stimulation nicht detektiert werden. Die Hybridisierung mit Kontroll-Antikörpern an Gesamtproteinextrakten von HaCaT-Zellen ist in Abbildung 3.23 exemplarisch gezeigt. Die entsprechenden Experimente für A431- und CaCo2-Zellen erbrachten identische Ergebnisse (nicht gezeigt).

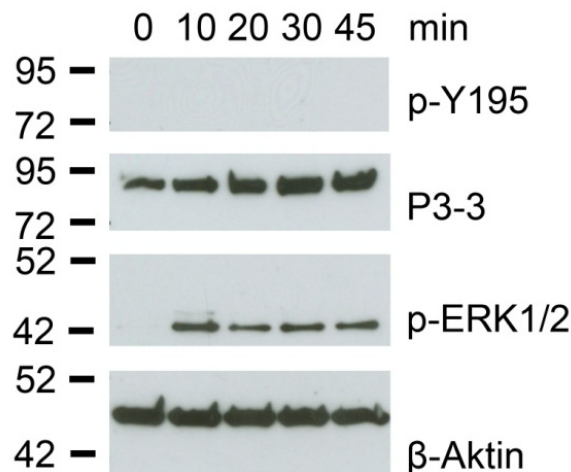


Abbildung 3.23: Immunbiochemische Analysen von IGF-1-behandelten HaCaT-Zellen.

HaCaT-Zellen wurden nach Serum-Entzug mit 5 ng/ml IGF-1 über die angegebenen Zeiträume behandelt. Gesamtproteinextrakte wurden mittels eines 10%-iges SDS-Gels separiert und im Folgenden auf eine Membran übertragen. Die Hybridisierung mit polyklonalen Antikörpern gegen p-Y195 zeigte kein Signal. PKP3 konnte mit einem polyklonalen Antikörper bei 87 kDa detektiert werden (P3-3). Die Stimulation wurde mit Phospho-ERK1/2 kontrolliert und detektiert bei 42 und 44 kDa die phosphorylierten MAP-Kinasen (p-ERK1/2). Die Abbildung ist repräsentativ für vier parallele Wiederholungen des Versuchs und identisch für alle getesteten Zelllinien. Alle Größenangaben in Kilodalton (kDa).

Mit dem Wachstumsfaktor IGF-1 konnten A431-, HaCaT- und CaCo2-Zellen stimuliert werden. Die Stimulation wurde mit Antikörpern gegen Phospho-ERK1/2 nachgewiesen, wobei eine auffällige Aktivierung nur an MAP-Kinase 42 auftrat. Die Aktivierung von MAP-Kinase 44 konnte ausschließlich nach 10 Minuten mit einem schwachen Signal detektiert werden. Das Stimulationssignal blieb über den untersuchten Zeitabschnitt von 45 Minuten konstant.

3.8.3 Stimulation mit dem Hepatozyten Wachstumsfaktor HGF (Scatter Faktor)

HGF ist ein multifunktionaler Wachstumsfaktor, der sowohl das Zellwachstum als auch die Zell-Motilität beeinflusst. HGF wird von mesenchymalen Zellen sezerniert und entfaltet seine Wirkung vor allem auf epitheliale Zellen und Hepatozyten. HGF ist ein heterodimeres Molekül mit einem Molekulargewicht von 78 kDa.

Der verwendete rHGF wurde in Insektenzellen exprimiert, wodurch eine korrekte Assemblierung der beiden Aminosäure-Ketten gewährleistet wurde. A431-, HaCaT- und CaCo2-Zellen wurden nach 24-stündigem Serum-Entzug mit 20 ng/ml rHGF induziert und nach 10, 20, 30 und 60 Minuten mit Laemmli-Ladepuffer lysiert. Die Gesamtproteinextrakte wurden auf einem 10%-igem SDS-Gel separiert und im Western Blot auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die Western Blot Hybridisierung mit Antikörpern gegen p-Y195 zeigte in vier unabhängigen Durchführungen und an allen verwendeten Zelltypen kein Signal. Die Integrität des Experiments konnte durch Hybridisierung mit Kontroll-Antikörpern gegen PKP3, Phospho-ERK1/2 und β -Aktin belegt werden (vgl. Abb. 3.24).

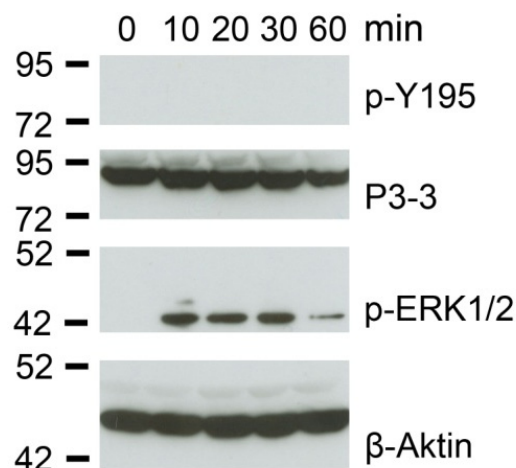


Abbildung 3.24: Immunbiochemische Analysen von HGF-behandelten HaCaT-Zellen.

Gesamtproteinextrakte HGF-behandelter HaCaT-Zellen wurden für die SDS-PAGE verwendet und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Die Tyrosin-Phosphorylierung von PKP3 an Aminosäure Y195 trat nicht auf. PKP3 wurde mit polyklonalen Antikörper bei 78 kDa detektiert (P3-3). Die Stimulation konnte mit einem monoklonalen Antikörper gegen Phospho-ERK1/2 gezeigt werden. Die Homogenität der Probenauflagerung wurde durch Hybridisierung von β -Aktin gezeigt. Banden des Größenstandards in Kilodalton (kDa).

Die Aktivierung der MAP-Kinasen 42 und 44 infolge einer HGF-Behandlung konnte bereits an HaCaT-Zellen gezeigt werden [Gille *et al.*, 1998]. Die Hybridisierung mit dem monoklonalen Phospho-ERK1/2-Antikörper bestätigte dies. Die Stimulation war über einen Zeitraum von etwa 30 Minuten konstant und nahm nach 60 Minuten ab. Das Ergebnis wurde in mehreren unabhängigen Wiederholungen bestätigt und war für alle Zelllinien identisch.

Somit war die Phosphorylierung von PKP3 am Tyrosin-Rest Y195 unter Verwendung dreier verschiedener Wachstumsfaktoren (EGF, IGF-I, HGF) nicht nachweisbar. Weitere Stimulationsexperimente wurden an dieser Stelle nicht durchgeführt. Um die Phosphorylierung des Tyrosin-Rests weiter zu charakterisieren, sollte auf Behandlungen mit dem Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor Pervanadat aufgebaut werden, die in den folgenden Abschnitten beschrieben sind.

3.8.4 Charakterisierung der Phosphorylierung von PKP3 an Y195 durch Pervanadat-Behandlung

Die bisherigen Analysen ergaben, dass die Verwendung von Pervanadat zur Stabilisierung der Phosphorylierung von PKP3 an Y195 führte. Diese Phosphorylierung wurde in A431-, HaCaT-, CaCo2- und PKP3-transfizierten PLC-Zellen nachgewiesen (vgl. Abschn. 3.7.4.1 und 3.7.4.2). Ausgehend von dieser Beobachtung wurde die Pervanadat-induzierte Phosphorylierung von PKP3 weiter charakterisiert.

Zunächst wurde die Phosphorylierung in Abhängigkeit der eingesetzten Pervanadat-Konzentration untersucht. Hierfür wurden HaCaT-Zellen mit zunehmenden Konzentrationen für 15 Minuten behandelt und anschließend mit Laemmli-Ladepuffer lysiert. Die Proteinextrakte wurden in einem SDS-Gel getrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. PKP3 und β -Aktin wurden mit spezifischen Antikörpern immunbiochemisch detektiert und das Ergebnis ist in der folgenden Abbildung 3.25 dargestellt.

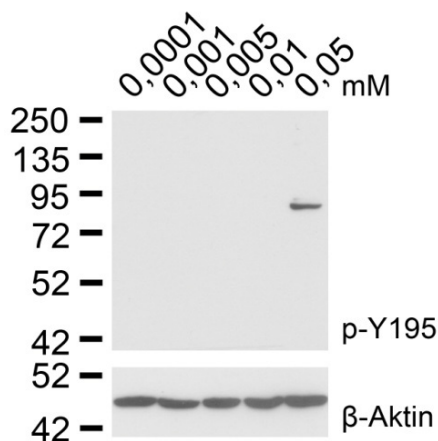


Abbildung 3.25:

Immunbiochemische Analyse der Y195-Phosphorylierung bei zunehmender Pervanadat-Konzentration.

HaCaT-Zellen wurden mit aufsteigenden Pervanadat-Konzentrationen behandelt und lysiert. Die Gesamtproteinextrakte wurden in einem 10%-igem SDS-Gel separiert und auf eine Membran geblottet. Die Hybridisierung mit polyklonalen Antikörpern gegen Y195-phosphoryliertes PKP3 (p-Y195) zeigte bei einer Konzentration von 0,05 mM ein Signal bei 87 kDa. Bei einem Molekulargewicht von 87 kDa kann Plakophilin 3 detektiert werden.

Die Tyrosin-Phosphorylierung von PKP3 an Aminosäure-Position Y195 konnte ab einer Pervanadat-Konzentration von 0,05 mM nachgewiesen werden. Die Konzentrationsabhängige Zunahme der generellen Tyrosin-Phosphorylierung konnte mit Hilfe eines Phospho-Tyrosin-spezifischen Antikörpers (p-Y20) bereits ab einer eingesetzten Pervanadat-Menge von 0,005 mM gezeigt werden (nicht abgebildet).

Im Folgenden wurde die Stabilität der Tyrosin-Phosphorylierung nach Entfernen des Pervanadats untersucht. Dieser Versuch sollte darüber Aufschluss geben können, inwieweit die Phosphorylierung an Y195 Ziel zellulärer Phosphatasen ist. Zu diesem Zweck wurden HaCaT-Zellen nach der Pervanadat-Behandlung mit PBS gewaschen und anschließend wieder mit Vollmedium kultiviert. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden die Gesamtproteine isoliert und auf einem 10%-igem SDS-Gel aufgetrennt. Die Western Blot Hybridisierung mit polyklonalen Antikörpern gegen Y195-phosphoryliertes PKP3 demonstrierte die Abnahme des Phosphorylierungs-spezifischen Signals über den gesamten untersuchten Zeitraum. 10 Minuten nach Entfernung des Pervanadats nahm die Intensität des Signals kontinuierlich ab und war nach 30 Minuten nicht mehr nachweisbar (Abbildung 3.26).

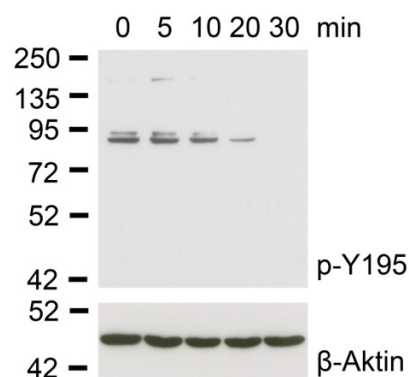


Abbildung 3.26: Immunbiochemische Analyse der Y195-Phosphorylierung nach Pervanadat-Entfernung.

HaCaT-Zellen wurden mit 0,1 mM Pervanadat behandelt, anschließend mit PBS gewaschen und mit Vollmedium weiter kultiviert. Nach den angegebenen Zeiten wurden die Gesamtproteine präpariert und für eine SDS-PAGE verwendet. Im Anschluss an den Western Blot wurde die Membran mit Antikörpern gegen PKP3 auf dessen Phosphorylierung an Y195 untersucht (p-Y195). Hierbei wurde eine zeitabhängige Abnahme der Tyrosin-Phosphorylierung nachgewiesen. Die Hybridisierung von β-Aktin mit monoklonalen Antikörpern diente als Ladekontrolle. Werte des Größenstandards in Kilodalton (kDa).

Die De-Phosphorylierung von Y195 an PKP3 könnte auf der Aktivität neu-synthetisierter Phospho-Tyr-Phosphatasen beruhen. Die Abnahme der generellen Tyrosin-Phosphorylierung wurde mit einem Phospho-Tyrosin-spezifischen Antikörper überprüft (p-Y20), der allerdings erst nach 30 Minuten eine leichte Abnahme des Signals zeigte (nicht gezeigt).

3.8.5 Einfluss von Src-Kinase-Inhibitoren auf Pervanadat-induzierte PKP3-Phosphorylierung an Y195

Die durch Pervanadat stabilisierte Phosphorylierung von PKP3 sollte durch die Verwendung von Tyrosin-Kinase-Inhibitoren gezielt manipuliert werden. Hierbei konzentrierten sich die Versuche insbesondere auf die Beobachtung eines Negativ-Effektes, der zum Verlust oder zur Abschwächung des Y195-Phospho-Tyrosin-Signals führte. Erste Anhaltspunkte zur Auswahl geeigneter Kinase-Inhibitoren wurden aus der Literatur gewonnen, wobei vor allem der Familie der Src-Kinasen eine besondere Bedeutung zukam. Für einzelne Familienmitglieder der Src-Kinasen wurde ein Zusammenhang mit Tyrosin-Phosphorylierungen von Zell-Zell-Verbindungsmolekülen bereits beschrieben und sollten daher Ansatzpunkt für die weitere Analyse sein [Miravet *et al.*, 2003; Lilien *et al.*, 2005; Mruk *et al.*, 2011]. In Tabelle 3.5 sind die eingesetzten Src-Kinase-Inhibitoren, ihre spezifischen Zielmoleküle und deren inhibitorische Konzentration (IC_{50}) aufgeführt.

Tabelle 3.5: Eigenschaften der verwendeten Src-Kinase-Inhibitoren (Herstellerangaben).

Inhibitor	Kinase	Inhibitor	Kinase
PP1	Lck ($IC_{50} \sim 5$ nM) Fyn ($IC_{50} \sim 6$ nM) Src ($IC_{50} \sim 170$ nM) Hck ($IC_{50} \sim 20$ nM)	SU6656	Yes ($IC_{50} \sim 20$ nM) Lyn ($IC_{50} \sim 130$ nM) Fyn ($IC_{50} \sim 170$ nM) Src ($IC_{50} \sim 280$ nM) Lck ($IC_{50} \sim 6,8$ μ M)
PP2	Lck ($IC_{50} \sim 4$ nM) Fyn ($IC_{50} \sim 5$ nM) Hck ($IC_{50} \sim 5$ nM)	Src-Inhibitor No. 5	Src ($IC_{50} \sim 10$ nM)

Für die Experimente wurden HaCaT-Zellen für 24 Stunden mit Serum-freiem Medium inkubiert. 15 Minuten vor der Pervanadat-Behandlung wurden die Zellen zunächst mit ansteigenden Konzentrationen (0, 1, 2, 4 μ M) der Src-Kinase-Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurde Pervanadat in einer Endkonzentration von 0,1 mM für 15 Minuten zugesetzt. Als Negativkontrolle wurden Zellen ausschließlich mit DMSO, dem Lösungsmittel der verwendeten Kinase-Inhibitoren, behandelt. Aus allen Ansätzen wurden schließlich die Gesamtproteine extrahiert und in einem 10%-igem SDS-Gel getrennt. Die Proteine wurden auf eine Membran geblottet und immunbiochemisch mit polyklonalen Antikörpern gegen

Y195-phosphoryliertes PKP3 detektiert. Zur Kontrolle wurde PKP3 (P3-3) und β -Aktin nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Abbildung 3.27 zusammengefasst.

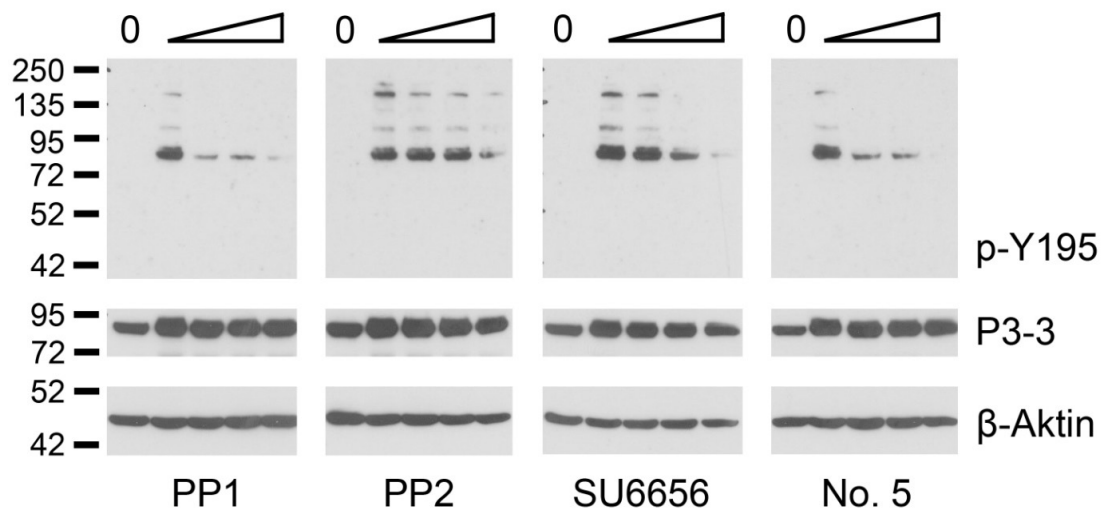


Abbildung 3.27: Immunbiochemische Analyse der Y195-Phosphorylierung nach Inkubation mit spezifischen Kinase-Inhibitoren und anschließender Pervanadat-Behandlung
HaCaT-Zellen wurden mit zunehmenden Konzentrationen verschiedener Src-Kinase-Inhibitoren (0, 1, 2, oder 4 μ M) inkubiert und anschließend mit Pervanadat behandelt. Als Negativkontrolle wurden HaCaT-Zellen ausschließlich mit DMSO versetzt (0). Proteinextrakte wurden durch Lyse mit Laemmli-Puffer gewonnen und in einem SDS-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und mit polyklonalen Antikörpern gegen Y195-phosphoryliertes PKP3 (p-Y195) und PKP3 (P3-3) analysiert. Die Detektion von β -Aktin mit monoklonalen Antikörpern diente als Ladekontrolle. Werte des Größenstandards sind in Kilodalton (kDa) angegeben.

Die Behandlung von HaCaT-Zellen mit DMSO hatte keinen Effekt auf den Phosphorylierungs-Status von PKP3 an Y195 (Abb. 3.27; 0). Erst durch Pervanadat-Behandlung wurde die Phosphorylierung von Y195 nachweisbar, welches ohne den Einsatz der Src-Kinase-Inhibitoren am deutlichsten ausfiel (0 μ M alle Proben). Diese stellen zugleich die Referenzen für die Wirkung der Inhibitoren dar. Die Src-Kinase-Inhibitoren No. 5 und PP1 hatten bereits in einer Konzentration von 1 μ M eine signifikante Abschwächung des p-Y195-Signals zur Folge. Diese Verringerung der Signalintensität wurde auch unter Verwendung des Inhibitors SU6656 beobachtet, allerdings erst ab einer Konzentration von 2 μ M. Die Inhibitoren No. 5, PP1 und SU6656 führten in der höchsten eingesetzten Konzentration zum fast vollständigen Verlust des p-Y195-Signals (4 μ M). Mit dem Src-Kinase-Inhibitor PP2 wurde in einer Konzentration von 1 und 2 μ M keine Verringerung der Phosphorylierung von PKP3 an Y195 festgestellt. Lediglich bei einer Konzentration von 4 μ M kam es zu einer leichten Abnahme des Phosphorylierungs-Signals. Unter Berücksichtigung der Wirkungsspektren der Inhibitoren und der restringierten Expressionsmuster einzelner Kinasen (Lck, Hck) trat die c-Src als wahrscheinlichste Kinase

für die Phosphorylierung von Y195 in PKP3 zu Tage, und wurde für eine weitergehende Analyse ausgewählt.

Die spezifische Aktivierung der c-Src-Kinase wurde durch die Behandlung mit Wasserstoff-Peroxid bereits mehrfach an unterschiedlichsten Zelltypen nachgewiesen [Abe *et al.*, 1999; Saksena *et al.*, 2008]. Daher sollte in den folgenden Experimenten der Einfluss von Wasserstoff-Peroxid auf die Phosphorylierung von PKP3 an Y195 untersucht werden.

3.8.6 Stimulation von HaCaT-Zellen mit Wasserstoff-Peroxid

In der Literatur findet sich bislang kein Hinweis darauf, welchen Einfluss die Behandlung mit Wasserstoff-Peroxid auf die humane Keratinozyten-Zelllinie HaCaT hat. Aus diesem Grund wurden HaCaT-Zellen mit 10 mM H₂O₂ inkubiert und nach definierten Zeitintervallen mit Laemmli-Puffer lysiert. Die Gesamtproteinextrakte wurden auf einem 10%-igem SDS-Gel aufgetrennt und geblottet. Die Stimulation sollte durch Hybridisierung mit einem monoklonalen Antikörper gegen phosphoryliertes ERK1 / 2 überprüft werden. Die Aktivierung dieser Kinasen durch Wasserstoff-Peroxid wurde bereits in der 1999 erschienenen Arbeit von Abe *et al.* beschrieben, welche ähnliche Experimente an Fibroblasten, Lymphozyten und Endothel-Zellen durchführten [Abe *et al.*, 1999]. Das Ergebnis der Western Blot Hybridisierung ist in Abbildung 3.28 dargestellt.

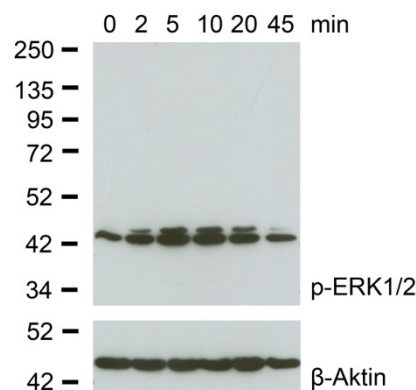


Abbildung 3.28: Immunbiochemische Analyse der Stimulation von HaCaT-Zellen durch Wasserstoff-Peroxid. HaCaT-Zellen wurden über unterschiedliche Zeiten (min) mit 10 mM H₂O₂ behandelt und zur Gewinnung eines Gesamtproteinextraktes lysiert. Die Proteinextrakte wurden für eine SDS-PAGE verwendet und anschließend im Western Blot auf eine Membran transferiert. Mit einem monoklonalen Antikörper gegen p-ERK1/2 wurde die Aktivierung infolge der Wasserstoff-Peroxid-Behandlung analysiert. Größenstandard in Kilodalton (kDa).

Die Aktivierung zellulärer Signalwege von HaCaT-Zellen durch Wasserstoff-Peroxid konnte durch die Detektion der Phosphorylierung von ERK1 / 2 belegt werden. Bereits fünf Minuten nach Zugabe wurde das Maximum der Aktivierung erreicht und über einen Zeitraum von ungefähr fünf Minuten aufrechterhalten. Die Abnahme der Stimulation könnte auf die

Zersetzung des Peroxidmoleküls durch zelluläre Peroxidasen und Katalasen zurückzuführen sein.

3.8.7 Nachweis der PKP3-Phosphorylierung an Y195 nach Wasserstoff-Peroxid-Behandlung

Es konnte gezeigt werden, dass durch Inkubation mit Wasserstoff-Peroxid intrazelluläre Signalwege in HaCaT-Zellen aktiviert werden. Da über die zugrunde liegenden Aktivierungs-Mechanismen wenig bekannt ist, und Wasserstoff-Peroxid auf viele zelluläre Effektor-Moleküle wirken kann, wurde dessen Wirkung auf die Phosphorylierung von PKP3 an Y195 untersucht. Zu diesem Zweck wurden HaCaT-Zellen 10 Minuten mit aufsteigenden Konzentrationen von Wasserstoff-Peroxid behandelt, wobei die Zellen 24 Stunden vor der Behandlung mit Serum-freiem Medium gefüttert wurden. Gesamtproteinextrakte wurden in einem SDS-Gel getrennt und im Western Blot auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die Membran wurde mit polyklonalen Antikörpern gegen Phospho-Y195 hybridisiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.29 dargestellt.

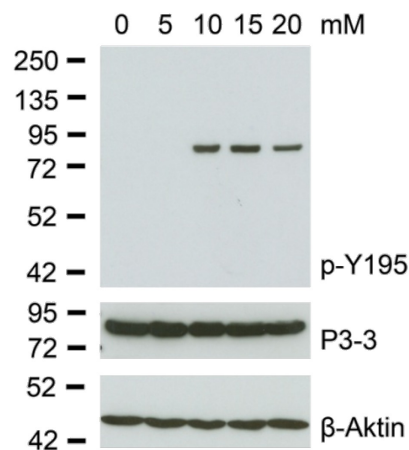


Abbildung 3.29: Immunbiochemische Analyse der Y195-Phosphorylierung nach Wasserstoff-Peroxid-Inkubation.

HaCaT-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen von Wasserstoff-Peroxid für 10 Minuten behandelt. Gesamtproteinextrakte wurden in einem 10%-igem SDS-Gel getrennt und geblottet. Die Hybridisierung mit polyklonalen Antikörpern gegen Y195-phosphoryliertes PKP3 zeigte das konzentrationsabhängige Auftreten der Phosphorylierung (p-Y195). PKP3 wurde mit polyklonalen Antikörpern detektiert (P3-3) und der β -Aktin-Nachweis diente als Ladekontrolle. Werte des Größenstandards in Kilodalton (kDa).

Die Wasserstoff-Peroxid-Behandlung führte in HaCaT-Zellen zur Phosphorylierung von PKP3 an Y195 (p-Y195). Die Phosphorylierung war ab einer H_2O_2 -Konzentration von 10 mM nachweisbar. Mit Hinblick auf mögliche zytotoxische Effekte der Wasserstoff-Peroxid-Behandlung wurde für die weiteren Experimente diese Konzentration eingesetzt, obwohl das Maximum bei einer Konzentration von 15 mM erreicht wurde. Im Folgenden sollte die Frage beantwortet werden, inwieweit die H_2O_2 -induzierte Phosphorylierung von PKP3 an Y195 durch Src-Kinasen katalysiert wurde.

3.8.8 Analyse der Wasserstoff-Peroxid induzierten Phosphorylierung unter Src-Kinase-Inhibition

HaCaT-Zellen wurden 24 Stunden vor der Behandlung mit Serum-freiem Medium kultiviert. Die entsprechenden Src-Kinase-Inhibitoren wurden 15 Minuten vor der Wasserstoff-Peroxid-Behandlung mit einer Endkonzentration von 1 μ M zugegeben. Anschließend wurden die Zellen 10 Minuten mit 10 mM Wasserstoff-Peroxid inkubiert. Nach Extraktion der Gesamtproteine wurden diese auf einem 10%-igem SDS-Gel getrennt und im Western Blot auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die Hybridisierung mit spezifischen Antikörpern ist in Abbildung 3.30 dargestellt.

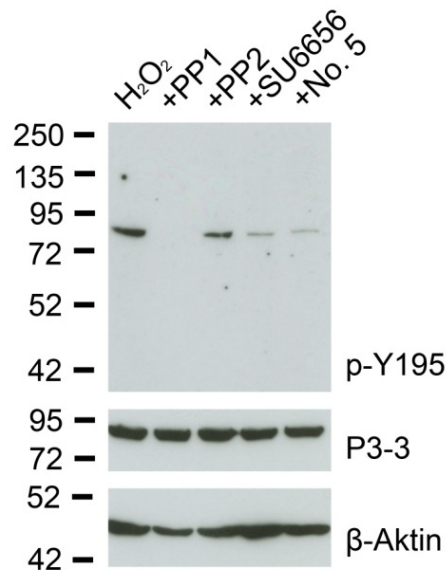


Abbildung 3.30: Immunbiochemische Analyse der Y195-Phosphorylierung nach Inkubation mit Wasserstoff-Peroxid unter spezifischen Kinase-Inhibition.

HaCaT-Zellen wurden mit 1 μ M der vier Src-Kinase-Inhibitoren (vgl. Tab. 3.5) und 10 mM Wasserstoff-Peroxid behandelt. Anschließend wurden Gesamtproteinextrakte hergestellt und auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und mit polyklonalen Antikörpern gegen Y195-phosphoryliertes PKP3 (p-Y195) hybridisiert. Zur Kontrolle wurde PKP3 mit polyklonalen Antikörpern nachgewiesen. Als Ladekontrolle ist β -Aktin mit monoklonalen Antikörper gezeigt. Alle Angaben des Größenstandards sind in Kilodalton (kDa) angegeben.

In der Kontrolle wurden HaCaT-Zellen ausschließlich mit Wasserstoff-Peroxid behandelt und mit dem p-Y195-Antikörper konnte phosphoryliertes PKP3 spezifisch nachgewiesen werden. Die Src-Kinase-Inhibitoren SU6656 und No. 5 führten zu einer deutlichen Verringerung des Phospho-spezifischen PKP3-Signals, welches nur knapp oberhalb der Detektions-Grenze lag. Die Verwendung des Inhibitors PP1 führte hier zur vollständigen Inhibition der Phosphorylierung von PKP3 an Y195, wobei allerdings in Wiederholungen des Versuchs bisweilen ebenfalls ein schwaches PKP3-Signal auftrat, welches in der Intensität den Inhibitoren SU6656 und No. 5 entsprach (nicht gezeigt). Der Inhibitor PP2 führte nur zu einer geringen Hemmung der Phosphorylierung von PKP3 an Tyrosin Y195. Auch diese Versuche

deuten darauf hin, dass die c-Src-Kinase als wahrscheinlichster Kandidat für die Phosphorylierung von PKP3 an Y195 in Betracht kommt und untermauern die vorherigen Ergebnisse.

3.8.9 Differentielle Extraktion von PKP3 nach Wasserstoff-Peroxid-Behandlung

Bereits durch Pervanadat-Behandlung wurde beobachtet, dass PKP3 während der differentiellen Extraktion stärker im löslichen Anteil auftrat (vgl. Abschn. 3.6). Inwieweit diese Verlagerung mit der gesteigerten Tyrosin-Phosphorylierung von PKP3 zusammenhängt, konnte in diesem Versuch nicht aufgelöst werden, da Pervanadat zu zahlreichen zellulären Veränderungen führt. Mit Hilfe des Sequenz-spezifischen PKP3-Antikörpers sollte das Extraktionsverhalten von PKP3 unter Wasserstoff-Peroxid schließlich detaillierter untersucht werden. Hierfür wurden HaCaT-Zellen nach 24-stündigem Serum-Entzug mit 10 mM Wasserstoff-Peroxid versetzt und weiter kultiviert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die zellulären Proteine differentiell extrahiert. Lösliche und unlösliche Fraktionen wurden anschließend in einem 10 %-igem SDS-Gel getrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Die Membran wurde mit poly- und monoklonalen Antikörpern hybridisiert. Die Ergebnisse dieser Hybridisierungen sind in der Abbildung 3.31 dargestellt.

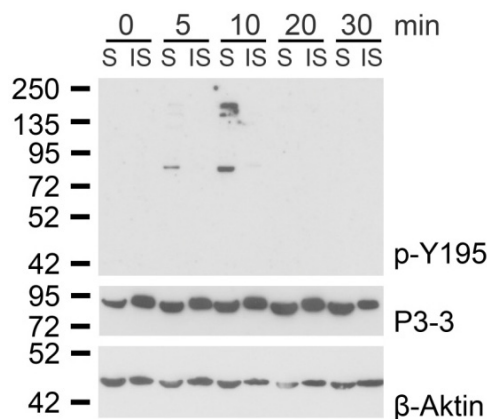


Abbildung 3.31: Extraktionsverhalten von PKP3 nach Wasserstoff-Peroxid-Behandlung.

HaCaT-Zellen wurden über die angegebenen Zeiträume mit 10 mM Wasserstoff-Peroxid behandelt und anschließend differentiell extrahiert. Die löslichen (S) und unlöslichen (IS) Fraktionen wurden in einem SDS-Gel separiert und geblottet. Die Sequenz-spezifische Phosphorylierung von PKP3 wurde mit polyklonalen Antikörpern detektiert (p-Y195). Mit polyklonalen Antikörpern gegen PKP3 wurde das gesamte zelluläre PKP3 nachgewiesen (P3-3). Größenangaben in Kilodalton (kDa).

Gesamt-PKP3 wurde mit polyklonalen Antikörpern detektiert (P3-3). Zu Beginn des Experiments wurde in der löslichen Fraktion weniger PKP3 nachgewiesen als in der unlöslichen (0 Minuten). Dieses Ergebnis korrelierte mit bereits gewonnenen Daten aus früheren Versuchen (vgl. Abschn. 3.6). Nach fünf-, zehn- und 20-minütiger Wasserstoff-Peroxid-Behandlung zeigte sich sukzessive eine Verschiebung der PKP3-Verteilung in die löslichen

Anteile. So wurde PKP3 nach zehn und 20 Minuten in beiden Fraktionen ungefähr in der gleichen Menge nachgewiesen. Erstaunlicherweise verschob sich dieses Verhältnis weiter, denn nach 30-minütiger Wasserstoff-Peroxid-Behandlung konnte PKP3 in der löslichen Fraktion in größerer Menge detektiert werden. Die Homogenität der Probenauftragung wurde durch die Detektion von Aktin gewährleistet. Die Phosphorylierung von PKP3 an Y195 konnte nur in den löslichen Fraktionen gezeigt werden und war ausschließlich nach fünf und zehn Minuten detektierbar. Hierbei ist allerdings nicht eindeutig unterscheidbar, ob PKP3 zunächst phosphoryliert wird, und dann erst im löslichen Extrakt auftritt, oder PKP3 an Y195 nur im löslichen Anteil durch die Src-Kinase phosphoryliert wird.

3.9 Vorbetrachtungen zum Screening einer cDNA-Bibliothek

Parallel zu den Experimenten mit Pervanadat- und Wasserstoff-Peroxid (siehe vorangegangene Kapitel) wurde ein alternativer experimenteller Ansatz unternommen, um die verantwortliche Kinase für die orts-spezifische Phosphorylierungen von PKP3 zu identifizieren. Zu diesem Zweck sollte eine in Bakteriophagen klonierte cDNA-Expressions-Bibliothek mit Phosphorylierungs-spezifischen Antikörpern untersucht werden. cDNA-Bibliotheken repräsentieren die Gesamtheit der exprimierten mRNAs zum Zeitpunkt der RNA-Isolation, und da Kinasen bei vielen zellulären Prozessen beteiligt sind, werden diese bei der Generierung der cDNA-Bibliotheken ebenfalls auftreten. Wie bereits in früheren Arbeiten gezeigt wurde, führt die Expression von cDNA-kodierten Tyrosin Kinasen in *Escherichia coli* zu einem katalytisch, aktiven Enzym, welches mit Phosphorylierungs-spezifischen Antikörpern identifiziert werden kann [Pasquale *et al.*, 1989].

3.9.1 Herstellung des PKP3-Expressionsplasmids und Präparation der Wirtsbakterien

Da in dieser Arbeit die Tyrosin-Phosphorylierung von PKP3 ein zentraler Aspekt war, wurde die von Pasquale und Singer beschriebene Methode entsprechend modifiziert. Als Phosphorylierungssubstrat sollte in den Bakterien den Phagen-kodierten Kinasen dementsprechend der Bereich von PKP3 angeboten werden, der für die Phosphorylierung in Frage kommt. Zu diesem Zweck wurde ein 1,3 kbp großes Fragment, welches den N-terminalen Kopfbereich von PKP3 (cDNA-Klon pNPP3) umfasste, in den bakteriellen Expressionsvektor pQE30 kloniert. Das Vektorkonstrukt wurde durch Restriktionsspaltungen auf die richtige Insertion des PKP3-Fragments überprüft und für die Transformation von *Escherichia coli* XL1-Blue MRF Kan^R verwendet. Die PKP3-Expression wurde in den Bakterien durch den lac-Repressor reprimiert und erst durch Zugabe von IPTG induziert. Zum

Nachweis der IPTG-abhängigen Expression des PKP3-Fragments wurden *Escherichia coli* XL1-Blue MRF Kan^R [pQE30-NPP3] Zellen kultiviert und nach Erreichen der gewünschten optischen Dichte mit IPTG induziert. Die Kultur wurde dann weiterhin inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten zur Extraktion bakterieller Proteine genutzt, die in einem SDS-Gel separiert wurden. Die Expression des PKP3 N-Terminus konnte durch Coomassie-Färbung gezeigt werden und ist in Abbildung 3.32 dargestellt.

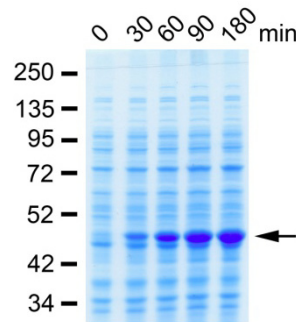


Abbildung 3.32: Expression des rekombinanten PKP3-Fragments nach IPTG-Induktion der Wirtsbakterien. *Escherichia coli* XL1-Blue MRF Kan^R [pQE30-NPP3] Zellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert und anschließend mit 1 mM IPTG induziert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden bakterielle Zellextrakte gewonnen und in einem 10%-igem SDS-Gel getrennt. Durch Coomassie-Färbung wurden alle Proteine detektiert und die induzierte Expression des 45 kDa PKP3-Fragments konnte gezeigt werden (Pfeil). Alle Größenangaben sind in Kilodalton (kDa) angegeben.

Mit dem Nachweis der PKP3-Expression konnten die Wirtsbakterien für die Durchmusterung der cDNA-Bibliothek verwendet werden.

3.10 Screening der cDNA-Bibliothek mit monoklonalen Phospho-Tyrosin-Antikörpern

Die verwendete cDNA-Bibliothek repräsentiert Gesamt-RNA aus humaner Leber und ist in den Uni-ZAP XR-Vektor eingefügt (Stratagene, Heidelberg). Die Bibliothek wurde freundlicherweise von Herrn Dr. E. Maser (Christian-Albrechts-Universität, Kiel) zur Verfügung gestellt. Für das Screening auf Phospho-Tyrosin-Kinase-Aktivität wurden *Escherichia coli* XL1-Blue MRF Kan^R [pQE30-NPP3] Zellen mit $2,16 \times 10^6$ Plaque Forming Units (pfu) der Bibliothek infiziert. Nachdem einzelne Plaques erkennbar waren, wurden die Expression des cDNA-Konstruktes und die Expression von PKP3 durch das Auflegen einer IPTG-getränkten Nitrozellulose-Membran induziert. Diese wurde im Anschluss zur immunbiochemischen Detektion der Tyrosin-Phosphorylierung mit monoklonalen Antikörpern (pY20 und P-Tyr-100) hybridisiert. Phospho-Tyrosin positive Plaques der ersten Selektionsrunde wurden isoliert und in weiteren Selektionsrunden sukzessiv vereinzelt. Die Selektion wurde für einzelne Phagen beendet, wenn sich diese monoklonal herausstellten. In

der folgenden Abbildung ist die Detektion von Tyrosin-Phosphorylierungen innerhalb einzelner Plaques aus der zweiten Selektionsrunde exemplarisch dargestellt.

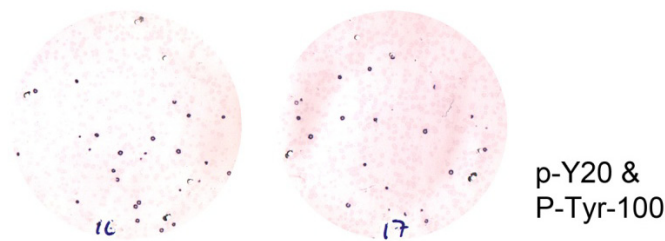


Abbildung 3.33: Immunbiochemische Analyse von Plaques auf Phospho-Tyrosin-Aktivität.

Escherichia coli XL1-Blue MRF Kan^r [pQE30-NPP3] wurden mit einer Phagen-Expressions-Bibliothek infiziert und nach 3- bis 4-stündiger Inkubation mit einer IPTG-getränkten Nitrozellulose-Membran induziert. Die Membran wurde anschließend mit monoklonalen Antikörpern gegen phosphorylierte Tyrosin-Reste (pY20 und P-Tyr-100) hybridisiert. Die Detektion der Antikörper erfolgte mittels Alkalischer Phosphatase in einer BCIP/NBT-Färbelösung. Gezeigt ist das Detektions-Ergebnis an zwei Nitrozellulose-Membranen aus der zweiten Selektionsrunde.

Das Screening der cDNA-Bibliothek resultierte in 24 Phagen-Klonen, die nach Infektion von Wirtsbakterien zu einer nachweisbaren Tyrosin-Kinase-Aktivität führten. Die monoklonalen Phagen-Suspensionen wurden schließlich für die *in vivo* Exzision verwendet, um die Identität des cDNA-Abschnittes zu bestimmen. Der methodische Ablauf der *in vivo* Exzision ist in Abschnitt 2.13.16 ausführlich beschrieben und resultierte in der Isolierung von pBluescript Phagemiden, deren Inserts mit T3- und T7-Primern mittels Sequenzanalyse charakterisiert wurden. Die hierbei identifizierten Tyrosin-Kinasen sind in Tabelle 3.6 aufgeführt.

Tabelle 3.6: Isolierte Tyrosin-Kinasen der cDNA-Bibliothek aus Lebergewebe.

Tyrosin-Kinase	Häufigkeit	Eigenschaften
Hck	22	Zytoplasmatische Tyrosin-Kinase
FES	1	Zytoplasmatische Tyrosin-Kinase
EPHB1	1	Rezeptor Tyrosin-Kinase

Die Ergebnisse der Sequenzierung legen ein Funktionieren des experimentellen Ablaufs nahe. Es wurde gezeigt, dass die Verwendung von Phospho-spezifischen Antikörpern die Identifizierung von Tyrosin-Phosphorylierungen in bakteriellen Expressionsbibliotheken erlaubt. Unklarheiten beim Resultat bestehen allerdings in Bezug auf die Zahl der identifizierten Tyrosin-Kinasen und deren jeweilige Häufigkeit. So ist das häufige Auftreten der Hck-Kinase und das vollkommene Fehlen weiterer Kinasen der Src-Familie auffällig, da Hck in Hepatozyten eher selten exprimiert werden sollte, aber andere, wie Fyn oder Src selber regelmäßig exprimiert werden sollten. Dennoch wurden die isolierten Phagen benutzt, um mit

diesen die PKP3 Phosphorylierung an Y195 zu untersuchen. Hierzu wurden Wirtsbakterien entsprechend mit dem zu untersuchenden Phagenklon infiziert, ausplattiert und eine IPTG-getränkte Nitrozellulose-Membran aufgelegt. Die Phosphorylierung von Y195 PKP3 sollte durch Hybridisierung mit polyklonalen Antikörpern (p-Y195) gezeigt werden, wobei allerdings keine der drei isolierten Kinasen zur Phosphorylierung des untersuchten Tyrosin-Restes führte. Dies legt nahe, dass die nachgewiesene Protein-Phosphorylierung durch die isolierten Kinasen an anderen Tyrosin-Resten erfolgt sein muss, während eine Phosphorylierung an Y195 von PKP3 wohl nicht stattfindet.

3.11 Phosphorylierung von PKP3 an Y195 durch c-Src

In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, dass der Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor Pervanadat zur Stabilisierung zellulärer Tyrosin-Phosphorylierungen führte und unter diesen Voraussetzung auch die Phosphorylierung von PKP3 am Tyrosin-Rest 195 nachgewiesen werden kann. Erste Vermutungen, dass die beobachtete Phosphorylierung durch die c-Src-Kinase katalysiert wurde, ergaben sich aus dem Einsatz der Src-Kinase-Inhibitoren. Dies wurde durch die Beobachtungen bei der Verwendung von Wasserstoff-Peroxid unterstützt, da diese reaktive Sauerstoff-Spezies unter anderem die c-Src-Kinase stimuliert und ebenfalls die Phosphorylierung von PKP3 an Y195 induzierte. Die Kombination der Wasserstoff-Peroxid-Behandlung mit Src-Kinase-Inhibitoren gab schlussendlich signifikante Hinweise auf die durch die c-Src-Kinase katalysierte Phosphorylierung von PKP3 am Tyrosin-Rest 195. Der direkte Nachweis dieses Phosphorylierungs-Ereignisses wurde im Folgenden in *in vitro* und *in vivo* Studien bestätigt.

3.11.1 *In vitro* Nachweis der Phosphorylierung von PKP3 an Y195 durch c-Src

Für die *in vitro* Phosphorylierung von PKP3 an Y195 wurde die c-Src-Kinase aus löslichen Proteinextrakten mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen das Protein präzipitiert. In einem Kinase-Assay wurde ein bakteriell hergestelltes PKP3-Fragment als Substrat verwendet. Dieses Protein wies aufgrund seines bakteriellen Ursprungs keine posttranslationalen Modifikationen auf und umfasste die N-terminale Kopfdomäne von PKP3. Der Kinase-Assay wurde parallel mit drei Negativkontrollen durchgeführt, in welchen jeweils eine der Präzipitations-Komponenten (Dynabeads, Lysat oder Antikörper) weggelassen wurde. Die Positivkontrolle diente dem eigentlichen Nachweis der Phosphorylierung. Zusätzlich wurde eine Inhibitor-Kontrolle durch Zugabe des Src-Kinase-Inhibitors PP1 durchgeführt, um die Abhängigkeit der Phosphorylierung von der c-Src-Kinase zu verifizieren. Die Phosphorylierungs-Produkte wurden auf ein 10%-iges SDS-Gel geladen und

aufgetrennt. Im Western Blot wurden die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und anschließend mit spezifischen Antikörpern hybridisiert. Die Ergebnisse des Experiments sind in Abbildung 3.34 dargestellt.

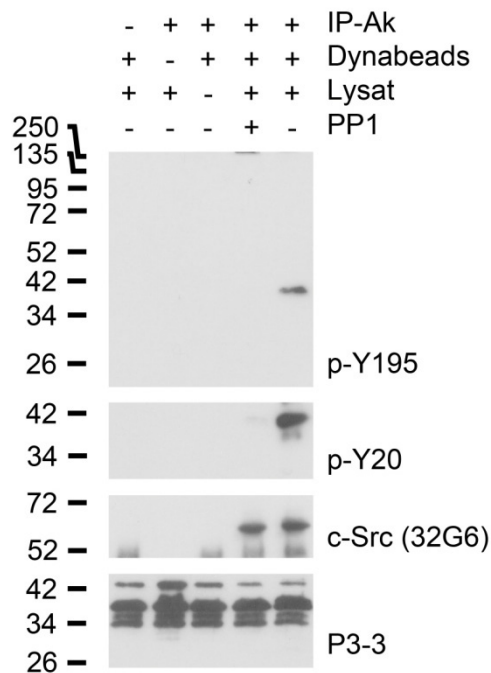


Abbildung 3.34: Immunbiochemische Analyse des *in vitro* Kinase-Assays.

Die c-Src-Kinase wurde mit einem monoklonalen Antikörper aus löslichen Proteinextrakten von HaCaT-Zellen präzipitiert. In Negativkontrollen wurde jeweils eine der Präzipitations-Komponenten weggelassen (Spur 1 bis 3). Die Präzipitations-Produkte wurden in einem Kinase-Assay mit rekombinantem PKP3 und wahlweise mit dem Src-Kinase-Inhibitor PP1 (Spur 4) inkubiert und anschließend in einem SDS-Gel separiert. Nach dem Western Blot wurden die Proteine mit monoklonalen Antikörpern gegen Phospho-Tyrosin (p-Y20) und die c-Src-Kinase (c-Src [32G6]), sowie polyklonalen Antikörpern gegen Y195-phosphoryliertes PKP3 (p-Y195) und PKP3 (P3-3) hybridisiert. Alle Größen sind in Kilodalton (kDa) angegeben.

Die Zugabe von rekombinantem PKP3 (rPKP3) im Kinase-Assay wurde durch Hybridisierung der Membran mit polyklonalen Antikörpern gegen PKP3 bestätigt (P3-3). Das Hauptsignal wurde auf einer Höhe von circa 38 kDa nachgewiesen und tritt neben zusätzlichen Banden, die zum Teil Degradationsprodukte darstellen, auf. Die Immunpräzipitation der c-Src-Kinase gelang ausschließlich in Präzipitations-Ansätzen, die alle nötigen Komponenten beinhalteten. Die Kinase konnte demzufolge lediglich in Spur 4 und 5 bei einem Molekulargewicht von 60 kDa detektiert werden (c-Src [32G6]). Die Phospho-Tyrosin Analysen mit dem monoklonalen Antikörper gegen Tyrosin-Phosphorylierungen (p-Y20) und den polyklonalen Antikörpern gegen Y195-phosphoryliertes PKP3 (p-Y195) zeigten lediglich in der letzten Spur ein Signal in der Höhe des zugegebenen rekombinanten PKP3-Fragmentes (vgl. Spur 5 und P3-3-Hybridisierung). Hierdurch konnte nachgewiesen werden, dass die c-Src-Kinase die Phosphorylierung von Y195 in PKP3

tatsächlich katalysieren kann. Durch Zugabe des Inhibitors PP1 wurde dieses Ergebnis zusätzlich untermauert, da die Phosphorylierung von PKP3 durch Inhibition der c-Src-Kinase komplett verhindert wurde (Spur 4).

3.11.2 In vivo Nachweis der Phosphorylierung von PKP3 an Y195 durch c-Src

Im *in vitro* Kinase Assay wurde demonstriert, dass die Phosphorylierung von PKP3 an Y195 durch die c-Src-Kinase katalysiert wird. Unter diesen Voraussetzungen sollten die bisherigen *in vivo* Studien, die lediglich auf der immunbiochemischen Analyse Pervanadat- oder Wasserstoff-Peroxid-behandelter Zellen beruhten, erweitert werden. Hierfür wurden vor allem bildgebende Methoden in Betracht gezogen, um eine Aussage auch hinsichtlich der zellulären Lokalisation bzw. der subzellulären Verteilung von Y195-phosphoryliertem PKP3 zu erhalten. Aus diesem Grund sollte die Phosphorylierung von PKP3 in Immunfluoreszenz-Färbungen untersucht werden. In vorangegangenen Färbungen an unterschiedlichen epithelialen Zellen wurde sowohl unter Verwendung von Pervanadat als auch von Wasserstoff-Peroxid eine desmosomale Färbung detektiert, die allerdings für beide Behandlungs-Methoden mit einer intensiven Hintergrundfärbung einherging. Darüber hinaus verursachten beide Substanzen phänotypische Veränderungen des Zellrasens, die eine genaue Interpretation der spezifischen Färbung erschwerten. Aus diesem Grund wurde in den folgenden Experimenten die c-Src-Kinase durch Transfektion der cDNA überexprimiert und der Einfluss hiervon auf die Phosphorylierung von PKP3 an Y195 untersucht.

Zur Klonierung der Src-Kinase wurde aus HaCaT-Zellen die Gesamt-RNA präpariert und für eine reverse Transkription und anschließender PCR mit c-Src-Kinase-spezifischen Primern verwendet. Die PCR-Reaktion wurde im Agarose-Gel analysiert und ergab ein PCR-Produkt der richtigen Größe von circa 1,6 kbp (nicht gezeigt). Nach Aufreinigung wurde das DNA-Fragment über eine TA-Klonierung in den Vektor pGEM-T Easy inseriert. Die Identität der klonierten cDNA wurde per Sequenzierung bestimmt und entsprach der bekannten Sequenz der c-Src-Kinase. Anschließend wurde das Konstrukt über einen Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *XhoI* in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA6/V5-His A kloniert. Für die Transfektion wurden CaCo2-Zellen bis zu einer Dichte von circa 50 % kultiviert und anschließend mit dem pcDNA6-c-Src-Konstrukt transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und für die Immunfluoreszenz-Färbung vorbereitet. Die c-Src-Kinase wurde mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper (Klon 17AT28) detektiert. Mit polyklonalen Antikörpern gegen Y195-phosphoryliertes PKP3 (p-Y195) wurde

die orts-spezifische Phosphorylierung von PKP3 nachgewiesen. Das Ergebnis der Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen ist in der nachfolgenden Abbildung 3.35 dargestellt.

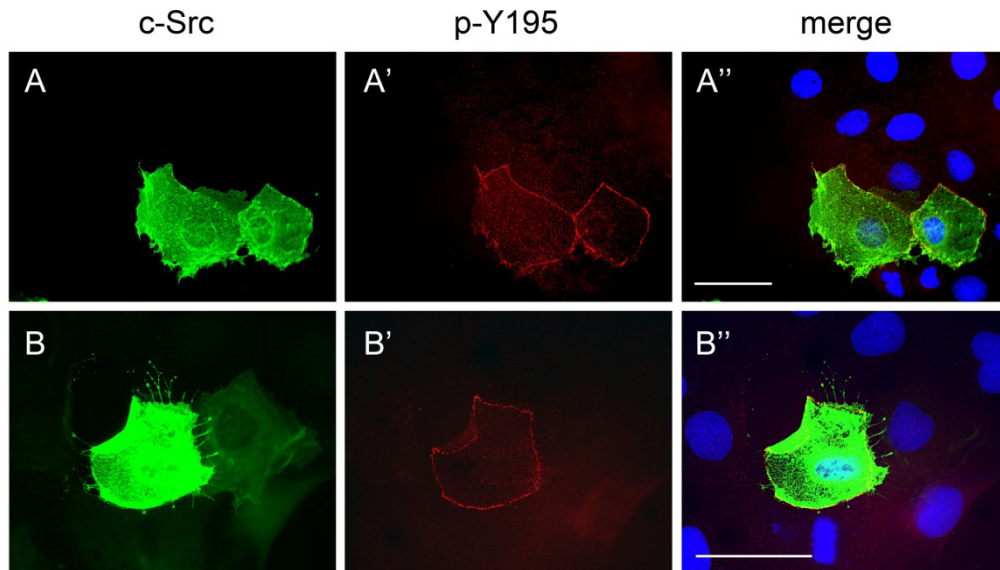


Abbildung 3.35: Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen von transient transfizierten CaCo2-Zellen.

CaCo2-Zellen wurden mit einem eukaryotischen c-Src-Kinase Expressionskonstrukt transfiziert und für Immunfluoreszenz-Färbungen verwendet. Die Überexpression der c-Src-Kinase wurde mit einem monoklonalen Antikörper nachgewiesen (Klon 17AT28) und ist in den Tafeln A und B abgebildet. Die Detektion von Y195-phosphoryliertem PKP3 ist in den Tafeln A' und B' dargestellt und wurde mit polyklonalen Antikörpern (p-Y195) durchgeführt. Die Überlagerung der Einzelfärbungen ist in den Abbildungen A'' und B'' gezeigt. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Größenstandard 20 µm.

Die Detektion der c-Src-Kinase in transfizierten Zellen zeigte eine ausgeprägte zytoplasmatische Färbung, die sich bis in die Bereiche der Zellgrenzen fortsetzte (Tafel A u. B). Untransfizierte Zellen wurden mit dem monoklonalen Antikörper gegen die c-Src-Kinase lediglich schwach gefärbt und zeigten eine ähnliche zytoplasmatische Färbung. Die Phosphorylierung von PKP3 am Tyrosin-Rest Y195 konnte ausschließlich in Zellen nachgewiesen werden, welche die c-Src-Kinase überexprimieren (A' und B'). Hierbei wurde eine zarte Färbung im Bereich der Zellgrenzen beobachtet, welche die gesamte Zelle umspannte und einer desmosomalen Markierung entsprach. Untransfizierte Zellen erbrachten mit dem polyklonalen Antikörper keine Reaktion.

3.12 Nachweis von Y195-phosphoryliertem PKP3 in Prostatatumoren

Die Phosphorylierung des Tyrosin-Restes 195 durch die c-Src-Kinase wurde in den vorangegangenen Kapiteln eindrucksvoll bewiesen. Inwieweit dieser Reaktion tatsächlich eine zell- oder tumorbiologische Signifikanz zukommt, sollte durch immunhistochemische Färbungen an Tumorgewebe überprüft werden. Da verschiedene Src-Kinasen bereits mit der Tumorentstehung und -progression in unterschiedlichen humanen Geweben in Verbindung

gebracht wurden, sollte der Phosphorylierungs-Status von PKP3 an Y195 unter diesem Aspekt untersucht werden [Summy *et al.*, 2003]. Prostatatumoren erschienen für die Beantwortung dieser Fragestellung besonders geeignet. So ergaben *in vitro* Untersuchungen an diversen abgeleiteten Zelllinien von Prostata-Adenokarzinomen eine gesteigerte Aktivität der c-Src-Kinase [Chang *et al.*, 2006]. PKP3 wurde in diesen Zelllinien zumindest teilweise ebenfalls deutlich nachgewiesen und in Adenokarzinomen der Prostata konnte darüber hinaus eine Expressionszunahme in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad des Karzinoms festgestellt werden [Breuninger *et al.*, 2010].

Zu diesem Zweck wurden mit Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeproben von Adenokarzinomen der Prostata ausgewählt. Hierbei wurden sowohl gut und mäßig als auch schlecht differenzierte Karzinome ausgewählt, die mit einem monoklonalen Antikörper gegen PKP3 (Klon PKP3-310.9.1) und dem polyklonalen Phosphorylierungs-spezifischen Antikörper (p-Y195) hybridisiert wurden. Der monoklonale PKP3-spezifische Antikörper zeigte in gut und mäßig differenzierten Adenokarzinomen (Gleason Score bis 7, n = 2) der Prostata ausgeprägte Färbungen an den Zellgrenzen der atypischen Drüsenverbände, wobei apikale Bereiche besonders hervortraten (vgl. Abb. 3.36). Das zwischen den Tumordrüsen gelegene Stroma wurde nicht angefärbt. Der Y195-spezifische Phosphorylierungs-Antikörper zeigte in diesen Geweben keine Färbung.

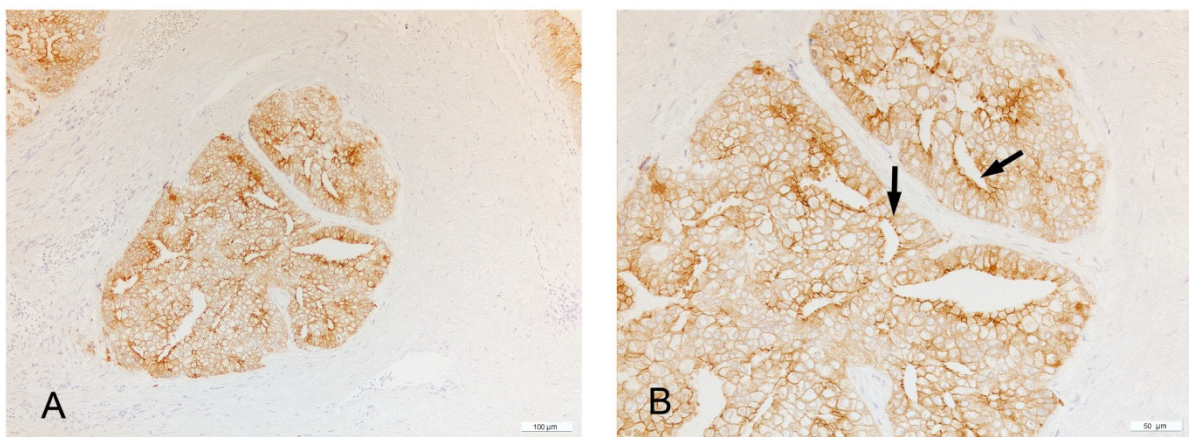


Abbildung 3.36: Immunhistochemische Färbungen an mäßig differenzierten Adenokarzinomen der Prostata. Die Detektion von PKP3 an Schnitten von Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben aus Prostatatumoren zeigt eine Färbung der Zellgrenzen im Bereich der tumorösen Drüsenstrukturen. Hier sind die apikalen Desmosomen entlang der Lumina besonders intensiv gefärbt (Pfeile). Mesenchymales Gewebe ist PKP3 negativ.

In schlecht differenzierten Adenokarzinomen (Gleason Score 8 – 10, n = 7) war die Polarität der atypischen Prostataadrüsen aufgehoben, was sich in einer homogenen Färbung der Zellgrenzen mit dem PKP3-spezifischen Antikörper äußerte. Darüber hinaus konnte eine deutliche Anfärbung des Zytoplasmas mit diesem Antikörper registriert werden (vgl. Abb. 3.37 A). Der Phosphorylierungs-spezifische PKP3-Antikörper zeigte in einigen

Gewebsproben eine punktförmige bis plaqueartige, teils auch lineare Färbung entlang der Zellgrenzen (vgl. Abb. 3.37 B und C). Reaktionen traten wiederholt auch in kribriformen Drüsenanteilen auf, die allerdings auf einzelne Tumorareale beschränkt blieben. In Abbildung 3.37 sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen an schlecht differenzierten Adenokarzinomen der Prostata exemplarisch illustriert.

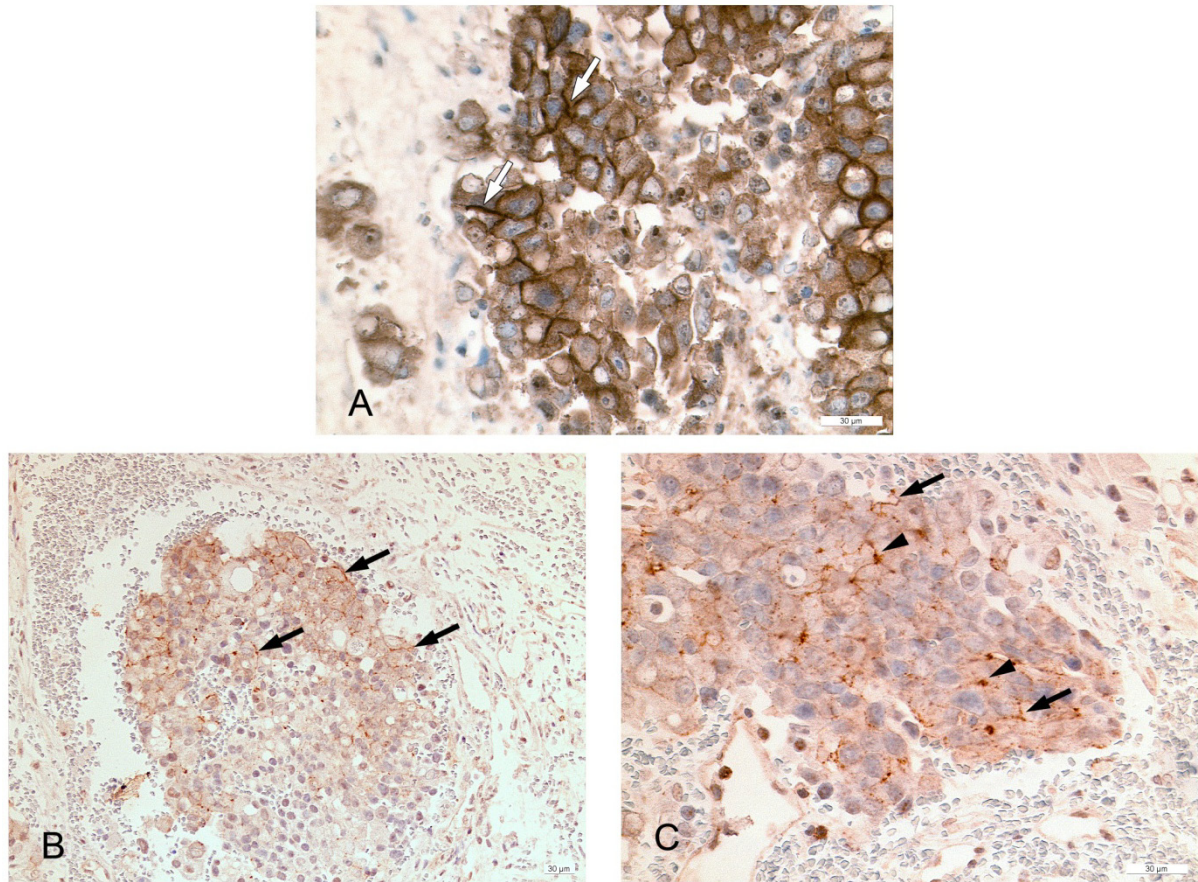


Abbildung 3.37: Immunhistochemische Färbungen an schlecht differenzierten Adenokarzinomen der Prostata. Mit Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Adenokarzinome der Prostata wurden mit PKP3-spezifischen Antikörpern hybridisiert. (A) Färbungen mit einem monoklonalen PKP3-Antikörper zeigen eine homogene Färbung entlang der Zellgrenzen ohne auffällige Polaritäten (Pfeile). Das Zytoplasma ist ebenfalls gefärbt. (B und C) Der Phospho-Y195-spezifische PKP3-Antikörper zeigt punktuelle Strukturen im Bereich der Zellgrenzen (Pfeile), mit einigen intensiver gefärbten plaqueartigen Aggregaten (Pfeilspitzen).

Die Untersuchung von neun unterschiedlich differenzierten Prostatatumoren ergab in drei Fällen (33 %) eine Phosphorylierungs-spezifische Färbung in analogen Tumorarealen. Diese Reaktion war jedoch ausschließlich beschränkt auf schlecht differenzierte Adenokarzinome.

3.13 Anhang Ergebnisse

3.13.1 Charakterisierung des polyklonalen p-Y84-Antikörpers

Gesamtproteinextrakte von verschiedenen unbehandelten Zelllinien wurden in einem 10%-igen SDS-Gel aufgetrennt und für die immunbiochemische Analyse des p-Y84-Antikörpers verwendet. Die Hybridisierung mit dem p-Y84-Antikörper zeigte kein PKP3. Jedoch wurden bei einem Molekulargewicht von circa 55 kDa in allen untersuchten Zelllinien mehrere Proteine detektiert (vgl. Abb. 3.38).

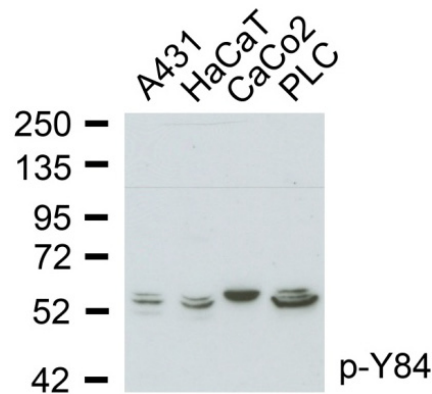


Abbildung 3.38: Immunbiochemische Analyse des p-Y84-Antikörpers.

Gesamtproteinextrakte unbehandelter Zellen wurden auf ein SDS-Gel aufgeladen und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Die Western Blot Hybridisierung mit gereinigten polyklonalen Antikörpern gegen p-Y84 zeigte in allen Zelllinien Signale bei ~55 kDa. Alle Größenangaben in Kilodalton (kDa).

Da diese Proteinbanden ebenfalls in der PKP3-defizienten Zelllinie PLC detektiert wurden, handelte es sich um eine PKP3-unabhängige Kreuzreaktion des Antikörpers. Diese konnte durch Veränderung des Aufreinigungsschemas nicht beseitigt werden, weshalb der Antikörper in dieser Arbeit für keine weiteren Experimente verwendet wurde.

3.13.2 Charakterisierung des polyklonalen p-Y210-Antikörpers

Für die Analyse des p-Y210-Antikörpers kamen unbehandelte und Pervanadat-behandelte Gesamtproteinextrakte zum Einsatz. Die immunbiochemische Charakterisierung an unbehandelten Zellen zeigte in allen untersuchten Zelllinien kein PKP3. Darüber hinaus wurden keine Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen festgestellt. Die Hybridisierung an Pervanadat-behandelten Zellextrakten zeigte in allen PKP3-exprimierenden Zelllinien ein homogenes, aber komplexes Bandenmuster. Neben mehreren Signalen bei einem Molekulargewicht von etwa 87 kDa, wurden weitere Signale im hoch- und niedermolekularen Bereich detektiert (vgl. Abb. 3.39).

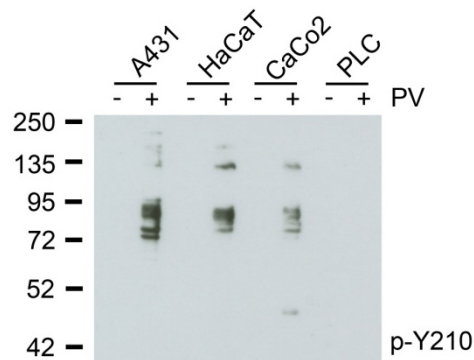


Abbildung 3.39: Immunbiochemische Analyse des p-Y210-Antikörpers.

Die Gesamtproteinextrakte unbehandelter und Pervanadat-behandelter Zellen wurden in einem 10%-igem SDS-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Die Western Blot Hybridisierung mit polyklonalen Antikörpern gegen p-Y210 zeigte ausschließlich nach Pervanadat-Behandlung und in PKP3-exprimierenden Zelllinien multiple Reaktionen. Alle Größenangaben in Kilodalton (kDa). PV - Pervanadat

Es konnte anhand dieser experimentellen Durchführung nicht geklärt werden, inwieweit die Antikörper eine Spezifität hinsichtlich phosphoryliertem PKP3 hatten.

Zu diesem Zweck wurde aus Pervanadat-behandelten und unbehandelten HaCaT-Zellen ein löslicher Proteinextrakt hergestellt und für eine PKP3-Immunpräzipitation genutzt. Für die Präzipitation wurde der PKP3-spezifische monoklonale Antikörper Klon 23E3/4 verwendet. Auf einem 10%-igem SDS-Gel wurden der Durchfluss, der erste Waschschrift und die Elution separiert und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Die Hybridisierung des p-Y210-Antikörpers an IP-Fractionen unbehandelter HaCaT-Zellen zeigte keine Reaktionen und bestätigte die Ergebnisse der Analyse an Gesamtproteinextrakten (vgl. Abb. 3.40 A). An der Pervanadat-behandelten Probe wurde hingegen eine Bande bei ~87 kDa detektiert, die mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers gegen PKP3 (P3-3) identifiziert wurde (vgl. Abb. 3.40 B).

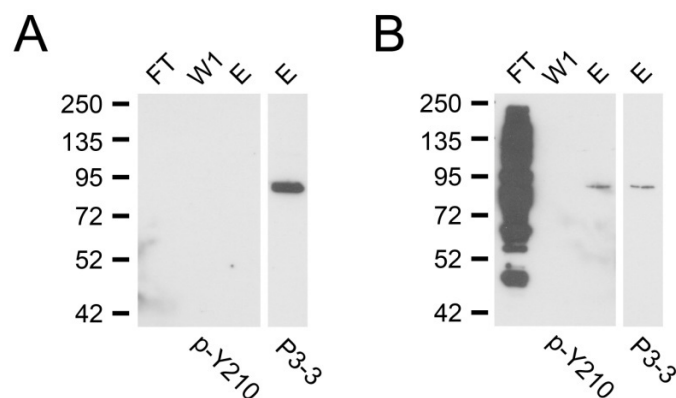


Abbildung 3.40: Immunbiochemische Analyse des p-Y210-Antikörpers nach Immunpräzipitation von PKP3.

PKP3 wurde aus löslichen Proteinextrakten von unbehandelten (A) und Pervanadat-behandelten (B) HaCaT-Zellen präzipitiert. Durchfluss (FT), Waschschrift 1 (W1) und Elution (E) wurden per SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden nach Western Blot mit dem p-Y210-Antikörper hybridisiert. Polyklonale PKP3-Antikörper bestätigen die Präzipitation (P3-3) von PKP3. Antikörper gegen p-Y210 detektieren PKP3 nur nach Pervanadat-Behandlung. Alle Größen in Kilodalton (kDa).

Die starke Kreuzreaktivität des p-Y210-Antikörpers, die ausschließlich im Durchfluss der Pervanadate-behandelten Probe zu beobachten war, lässt auf eine erhöhte Sensitivität gegenüber Tyrosin-Phosphorylierungen schließen.

Wie bereits für den p-Y195-Antikörper beschrieben, konnten die transfizierten PLC-Zellen zum direkten Nachweis für die Phospho-Tyrosin-Spezifität des Antikörpers verwendet werden (siehe Abschn. 3.7.4.2). Zu diesem Zweck wurden die stabil transfizierten PLC-Zellen (PKP3-Wildtyp und Y210F-Mutante) mit Pervanadat behandelt und für die Herstellung eines löslichen Proteinextraktes genutzt. Die Immunpräzipitation von PKP3 wurde erneut mit dem PKP3-spezifischen monoklonalen Antikörper Klon 23E3/4 durchgeführt und Durchfluss (FT), erster Waschriss und Elution mit dem p-Y210-Antikörper untersucht. Das Ergebnis der Western Blot Hybridisierung ist in Abbildung 3.41 dargestellt.

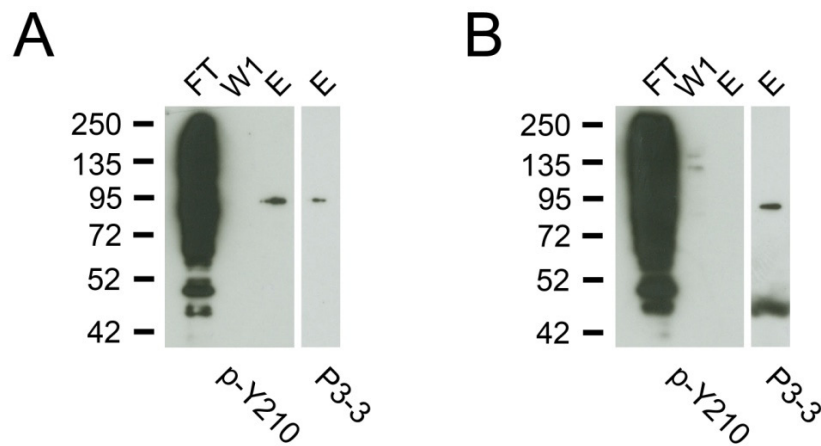


Abbildung 3.41: Immunbiochemische Analyse der Phospho-Tyrosin-Spezifität des p-Y210-Antikörpers. Stabil, transfizierte PLC-Zellen (PKP3-WT [A] und PKP3-Y210F [B]) wurden mit Pervanadat behandelt und zur Herstellung eines löslichen Proteinextraktes genutzt. Dieser Extrakt wurde für die Immunpräzipitation von PKP3 verwendet und die Fraktionen (Durchfluss [FT], Waschriss 1 [W1] und Elution [E]) wurden in einem 10%-igem SDS-Gel aufgetrennt. Die Western Blot Hybridisierung mit p-Y210-Antikörpern zeigte nur für die PKP3-WT-Zellen eine spezifische PKP3-Bande bei 87 kDa, die mit polyklonalen Antikörpern gegen PKP3 identifiziert wurde (P3-3). Größenangaben in Kilodalton (kDa).

Der Vergleich von Abbildung 3.41 A und B bestätigt das Vorhandensein von p-Y210-spezifischen Antikörpern nach der Affinitätsaufreinigung. Ausschließlich in PKP3-WT-transfizierten PLC-Zellen konnte p-Y210 PKP3 mit diesen Antikörpern nachgewiesen werden, wohingegen dies in PKP3-Y210F-transfizierten PLC-Zellen kein Ergebnis erbrachte. Die Substitution der Aminosäure an dieser speziellen Position unterdrückte das Auftreten einer Phosphorylierung, wodurch die Phospho-Site-Spezifität der p-Y210-Antikörper eindeutig gezeigt wurde. Da jedoch Kreuzreaktionen mit anderen Phospho-Proteinen (siehe Durchfluss) auftraten, wurde der Antikörper in dieser Arbeit nicht verwendet.

3.13.3 Charakterisierung des polyklonalen p-Y390-Antikörpers

Die Analyse der p-Y390 Antikörper an Gesamtproteinextrakten unbehandelter Zellen zeigte keine Reaktionen. Ähnlich dem p-Y210-Antikörper führte die Behandlung der Zellen mit Pervanadat zu einem komplexen Bandenmuster, welches in Abbildung 3.42 dargestellt ist.

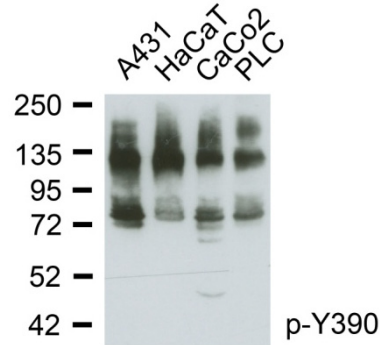


Abbildung 3.42: Immunbiochemische Analyse des gereinigten p-Y390-Antikörpers.

Gesamtproteinextrakte Pervanadat-behandelter, epithelialer Zellen wurden auf einem 10%-igem SDS-Gel getrennt und mit dem p-Y390-Antikörper hybridisiert. Ein spezifisches Signal in der Höhe von PKP3 konnte nicht ermittelt werden. Ein komplexes Bandenmuster wurde in allen untersuchten Zellen festgestellt. Alle Größenangaben in Kilodalton (kDa).

Da sich das Detektionsmuster jedoch identisch in PKP3-defizienten PLC-Zellen zeigte, musste es sich um Kreuzreaktionen des Antikörpers handeln. Da außerdem kein Signal in Höhe des PKP3-Molekulargewichts auftrat und eine veränderte Aufreinigung die Spezifität des Antikörpers nicht verbesserte, wurde dieser für die weiteren Experimente nicht berücksichtigt.

4. Diskussion

4.1 Phosphorylierungen modulieren die Eigenschaften von Zelladhäsions-Proteinen

Die zelluläre Adhäsion muss sich ständig wechselnden Anforderungen der Gewebe anpassen. Unter anderem ermöglichen es individuelle Modifikationen des Zytoskeletts und der Adhäsionsstrukturen, den Umbau- und Regenerationsprozesse der Gewebe jederzeit nachzukommen. [Sivamani *et al.*, 2007; Thomason *et al.*, 2012]. Die Eigenschaften werden durch verschiedenste Regulationsprozesse wie zum Beispiel Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsvorgänge zahlreicher Proteine dirigiert. Diese Veränderungen von Proteinen sind an der Regulation nahezu aller zellulären Prozesse beteiligt und sind Kernelemente vieler Signalwege. Obwohl von Zell-Zell-Verbindungsstrukturen wie Desmosomen und Adhärenz-Verbindungen immer angenommen wurde, dass sie eher starre zelluläre Komponenten darstellen, gibt es heute sehr gute Hinweise darauf, dass auch diese Strukturen hochflexibel und dynamisch sind und sein müssen [Bertocchi *et al.*, 2012]. Gerade hierbei spielen Phosphorylierungs-Vorgänge eine wesentliche Rolle, durch die die Strukturen an die zellulären Bedürfnisse angepasst werden.

Lösliche Komponenten der Adhärenz-Verbindungen wie β -Catenin und p120-Catenin (p120^{ctn}) wurden diesbezüglich bereits ausführlich untersucht [Nelson *et al.*, 2004; Pieters *et al.*, 2012]. Hierbei konnten durch viele einzelne Studien Zusammenhänge über die funktionelle Regulation der Moleküle durch zelluläre Kinasen und Phosphatasen aufgedeckt werden, obgleich das vollständige Wissen noch überaus lückenhaft ist. Tyrosin-Phosphorylierungen werden bei diesen Prozessen sowohl von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen als auch von zytoplasmatischen Tyrosin-Kinasen katalysiert und treten regelmäßig in Abhängigkeit von verschiedenen zellulären Wachstumsfaktoren auf. Die Phosphorylierungsvorgänge modulieren die Eigenschaften von β -Catenin und p120-Catenin und haben direkten Einfluss auf die interzelluläre Adhäsion [Nelson *et al.*, 2004].

Für Desmosomen sind ähnlich detaillierte Studien lediglich für Komponenten wie Plakoglobin und zum Teil Desmoplakin bekannt [Yin *et al.*, 2004]. Plakoglobin kommt sowohl in Adhärenz-Verbindungen als auch in Desmosomen vor und ist ebenfalls Substrat verschiedener Kinasen. Tyrosin-Phosphorylierungen an Plakoglobin führen zu veränderten Bindeeigenschaften mit anderen Zell-Zell-Verbindungsmolekülen, die sich allerdings in Abhängigkeit des jeweiligen Zellverbindungstyps konträr auswirken können [Gaudry *et al.*,

2001; Miravet *et al.*, 2003]. Für Desmoplakin wurde die Phosphorylierung eines C-terminalen Serin-Restes beschrieben, die einen regulatorischen Effekt auf die Interaktion mit den Intermediärfilamenten hat [Stappenbeck *et al.*, 1994]. Die Plakophiline (PKPs) kommen im Gegensatz zu Plakoglobin ausschließlich in den Desmosomen vor. Über die posttranslationalen Modifikationen der Plakophiline ist wenig bekannt und eine Zusammenstellung von Modifikationen liefern bisher lediglich verschiedene Phosphotomics-Studien. Nur für PKP2 wurden die funktionellen Effekte der Phosphorylierung eines Serin-Restes in der Kopf-Domäne ausführlicher beschrieben [Müller *et al.*, 2003]. Da Plakophilin 3 ein wesentlicher Bestandteil der desmosomalen Zelladhäsion ist und in fast allen Epithelien exprimiert wird, wurden die posttranslationalen Modifikationen dieses desmosomalen Proteins genauer untersucht. Im Verlauf der Arbeit wurde der Schwerpunkt auf eine Analyse von Tyrosin-Phosphorylierungen gelegt und mit Hilfe eines Sequenz-spezifischen Phosphorylierungs-Antikörpers ein Tyrosin-Rest eingehender untersucht.

4.2 PKP3 ist Ziel zellulärer Tyrosin-Kinasen, wobei der Phosphorylierung einzelner Tyrosin-Reste eine besondere Relevanz zukommt

Einige Phosphorylierungen an Tyrosin-Resten von PKP3 sind aus den Ergebnissen verschiedener massenspektrometrischer Untersuchungen bekannt [Wolf-Yadlin *et al.*, 2007; Heibeck *et al.*, 2009]. In der Datenbank PhosphoSitePlus sind Ergebnisse dieser und anderer Phosphotomics Studien zusammengeführt und eine Analyse der Phosphorylierungen von PKP3 in dieser Datenbank erbrachte nahezu ein Dutzend Tyrosin-Reste, die im phosphorylierten Zustand detektiert worden. Diese Daten stammen meist aus unterschiedlichen biologischen (meist Zellkultur-) Systemen und sind teilweise durch verschiedene äußere Einflüsse, wie Behandlung mit Wachstumshormonen, mit DMSO oder durch Serumentzug induziert. Eine direkte Abhängigkeit einzelner Phosphorylierungen von spezifischen Behandlungs-Methoden der Zellen ist bisher nicht bekannt und auch aus der Analyse der in der Datenbank gefundenen Phosphorylierungen für PKP3 nicht ersichtlich. Darüber hinaus wurden auch an vielen Serin- und Threonin-Resten Phosphorylierungen festgestellt, die insgesamt auf eine intensive Phosphorylierung von PKP3 schließen lassen.

Bei früheren Analysen von PKP3 mittels zwei-dimensionaler NEPHGE (Non-equilibrium-pH-gradient electrophoresis) konnte gezeigt werden, dass PKP3 ein stark basisches Protein ist und durch seine streifenförmige Auftrennung über einen größeren pH-Bereich zwischen pH 7 und pH 8,5 migriert [Schmidt *et al.*, 1999]. Eine Auflösung in individuelle isoelektrische

Varianten war Methoden-bedingt hierdurch nicht möglich. Eine genauere Analyse wurde durch eine zwei-dimensionale Auftrennung durch isoelektrische Fokussierung mit vorgefertigten Streifen eines pH-Bereichs von pH 7 bis pH 10 für die erste Dimension erreicht. Hierdurch wurde immunbiochemisch über den kompletten untersuchten Fokussierungs-Bereich bis in den neutralen pH-Bereich eine große Anzahl isoelektrischer PKP3-Varianten identifiziert (vgl. Abb. 3.1). Dieses Muster deutete auf eine intensive Modifikation, speziell durch Phosphorylierung von PKP3 hin, da besonders die Addition von Phosphat-Gruppen zu einer deutlichen Verschiebung des isoelektrischen Punktes von basischen Proteinen führt [Zhu *et al.*, 2005]. *In silico* Berechnungen bestätigten diese Annahme, wie Tabelle 3.1 zu entnehmen ist. Es ist entsprechend diesen Berechnungen eine gleichzeitige Phosphorylierung an bis zu zehn Aminosäuren nötig, um den pI eines PKP3-Proteins in den neutralen Bereich zu verschieben. Die Vielzahl von möglichen posttranslationalen Modifikationen konnte - zumindest teilweise - auf Tyrosin-Phosphorylierungen an PKP3 zurückgeführt werden, da immunpräzipitiertes PKP3 mit einem Phospho-Tyrosin-spezifischen Antikörper reagierte. Entsprechende Ergebnisse existieren ebenfalls für die Untersuchung von Serin- und Threonin-Phosphorylierungen (Dr. Jäger, unveröffentlichte Ergebnisse) und bestätigen die intensive Phosphorylierung von PKP3, die anhand der zwei-dimensionalen Gelelektrophorese bereits vermutet wurde.

Die Verwendung des Tyrosin-Phosphatase-Inhibitors Pervanadat verstärkt die Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen. Diese Pervanadat-abhängige Zunahme der Tyrosin-Phosphorylierung wurde bereits für Plakoglobin und weitere zelluläre Proteine beobachtet [Feng *et al.*, 1999; Garrod *et al.*, 2008b] und trifft ebenso auf PKP3 zu (siehe Abschn. 3.2). Dies deutet darauf hin, dass Tyrosin-Phosphorylierungen an PKP3 anscheinend nur transient auftreten und eng durch entsprechende Phosphatasen reguliert werden, da die Tyrosin-Phosphorylierungen erst durch die Inhibition zellulärer Phosphatasen detektiert bzw. stabilisiert werden können. Vermutlich kommt den Phosphorylierungs-Vorgängen an bestimmten Tyrosin-Resten von PKP3 eine allgemeinere funktionelle Bedeutung zu, die eine derartige Regulation notwendig machen. In diese Richtung deuten auch die Ergebnisse der bereits erwähnten Phosphotomics-Studien, bei denen Phosphorylierungen von bestimmten Tyrosin-Resten ungewöhnlich häufig nachgewiesen wurden (vgl. Tab. 3.3). Die Phosphorylierung an fünf dieser Tyrosin-Reste sollte im Zuge der weiteren Arbeit mit Hilfe polyklonaler Sequenz-spezifischer Phospho-Antikörper gegen PKP3 untersucht werden, die im Rahmen eines mehrstufigen Schemas zunächst aufgereinigt und anschließend

charakterisiert wurden (siehe Abschn. 3.7). Hierbei konnten von fünf Sequenz-spezifischen Phospho-Tyrosin-Peptiden nach der Immunisierung von Versuchstieren Antiseren gewonnen werden, von denen vier selbst nach Affinitätsaufreinigung noch deutliche Neben- oder Kreuzreaktionen zeigten, und damit für eine weitergehende Analyse nicht verwendet werden konnten (siehe Abschn. 3.13). Allerdings konnten spezifische polyklonale Antikörper gegen die Phosphorylierung des Tyrosin-Restes 195 von PKP3 isoliert werden, die zur Charakterisierung der spezifischen Tyrosin-Phosphorylierung genutzt wurden (siehe Abschn. 3.7).

4.3 Der PKP3 Tyrosin-Rest Y195 wird durch die c-Src-Kinase phosphoryliert

Die Dynamik von Adhärenz-Verbindungen und Desmosomen wird unter anderem durch reversible Tyrosin-Phosphorylierungen reguliert [Fuchs *et al.*, 1996; Brunton *et al.*, 2004]. In einer Vielzahl von Untersuchungen konnten Phosphorylierungs-Vorgänge an Zell-Adhäsionsmolekülen beobachtet werden. Diese werden katalysiert durch zytoplasmatische Tyrosin-Kinasen oder Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und haben unterschiedlichste Auswirkungen auf die Funktion der Moleküle.

Die Phosphorylierung von β -Catenin an Y142 und Y654 führt beispielsweise zur Destabilisierung der Adhärenz-Verbindungen. Hierbei hat die gezielte Phosphorylierung der Tyrosin-Reste einen Interaktionsverlust mit Cadherinen und α -Catenin zur Folge [Balsamo *et al.*, 1996; Roura *et al.*, 1999; Piedra *et al.*, 2003]. Katalysiert werden diese Phosphorylierungen durch Kinasen der Src-Familie (Fyn, Fer) und den Rezeptor des Epidermalen Wachstumsfaktors. Diese Kinasen phosphorylieren auch einzelne Tyrosin-Reste an p120-Catenin und haben damit ebenfalls einen Einfluss auf die Bindeeigenschaften des Moleküls [siehe Abschn. 1.3; Skoudy *et al.*, 1996; Ozawa *et al.*, 2001].

Wie weit diese Phosphorylierungs-abhängige Regulation von Zell-Adhäsionsmolekülen geht, wird am Beispiel des Plakoglobins besonders deutlich. Plakoglobin assoziiert sowohl mit klassischen als auch mit desmosomalen Cadherinen und lokalisiert damit in den Adhärenz-Verbindungen und den Desmosomen. Diese Eigenschaften des Proteins werden zumindest teilweise durch die Phosphorylierung spezifischer Tyrosin-Reste definiert. So katalysiert die c-Src-Kinase die Phosphorylierung des Tyrosin-Restes Y643, wodurch die Affinität zu E-Cadherin und α -Catenin herabgesetzt und gleichzeitig die Affinität zu Desmoplakin gesteigert wird [Miravet *et al.*, 2003]. Der entgegengesetzte Effekt wird durch Phosphorylierung am

Tyrosin-Rest Y549 erreicht, der durch die Kinasen Fyn und Fer, ebenfalls Mitglieder der Familie der Src-Kinasen Familie, katalysiert wird [Miravet *et al.*, 2003]. Darüber hinaus wird die Assoziation von Plakoglobin mit Desmoplakin durch den EGFR reguliert. Dieser phosphoryliert nach EGF-Stimulation die C-terminalen Tyrosin-Reste Y693, Y724 und Y729 von Plakoglobin, wodurch die Bindung mit Desmoplakin verhindert wird und die Assoziation zu den Intermediärfilamenten verloren geht [Miravet *et al.*, 2003]. Obwohl die Komplexität der Regulationsmechanismen von Zell-Zell-Verbindungen noch nicht vollständig verstanden ist, sind zumindest signifikante Einflüsse spezifischer Kinasen bzw. Kinase-Familien auf das Assoziationsverhalten offensichtlich.

Durch Verwendung des Sequenz-spezifischen Phospho-Antikörpers gegen Phospho-Y195 wurde in dieser Arbeit PKP3 als ein neues Substrat der c-Src-Kinase identifiziert. Wenn Epithelzellen mit Pervanadat und einzelnen Src-Kinase-Inhibitoren inkubiert werden, konnte gezeigt werden, dass einige Src-Kinase-Inhibitoren in der Lage waren, die Pervanadat-abhängige Phosphorylierung von PKP3 an Y195 zu vermindern. Die Verwendung verschiedener Src-Kinase-Inhibitoren mit unterschiedlichen Wirkungsspektren auf die einzelnen Src-Kinasen ermöglichte es, einen Großteil der Mitglieder der Src-Kinase-Familie auszuschließen und die c-Src-Kinase für die Phosphorylierung des Tyrosin-Restes in die engste Wahl zu ziehen. Diese Vermutung konnte in einem *in vitro* Kinase-Assay belegt werden (vgl. Abschn. 3.11.1). Hierbei wurde die c-Src-Kinase aus Zell-Lysaten immunpräzipitiert und zur Phosphorylierung eines rekombinanten PKP3-Fragments verwendet. Die Phosphorylierung konnte mit Hilfe des Sequenz-spezifischen Antikörpers gegen Phospho-Y195 in PKP3 nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.34). *In vivo* wurde die Phosphorylierung durch transiente Überexpression der c-Src-Kinase in epithelialen Zellen bestätigt (vgl. Abschn. 3.11.2). Obwohl die Phosphorylierung von PKP3 an Y195 durch die c-Src-Kinase katalysiert wird, kann derzeit nicht ausgeschlossen werden, dass zusätzlich weitere Tyrosin-Kinasen für die Phosphorylierung dieses Tyrosin-Restes in Frage kommen. Darüber hinaus ist es außerdem möglich, dass die c-Src-Kinase weitere Tyrosin-Reste von PKP3 phosphoryliert. Gründe für diese Vermutung lassen sich aus den Phosphorylierungs-Studien von Plakoglobin ableiten. Hier wird neben dem Tyrosin-Rest Y643 auch der Tyrosin-Rest Y133 durch die c-Src-Kinase phosphoryliert, allerdings ist die funktionelle Bedeutung dieser Modifikation bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht aufgeklärt [Miravet *et al.*, 2003].

4.4 Zelluläre Wachstumsfaktoren haben keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von PKP3 am Tyrosin-Rest Y195

Die Phosphorylierung von PKP3 an Y195 wurde in Phosphotomics-Studien mehrfach gefunden und deutet in zwei Fällen auf eine Abhängigkeit vom Epidermalen Wachstumsfaktor hin [Zhang *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2008]. Darüber hinaus existieren zahlreiche Studien, die die Aktivierung der c-Src-Kinase infolge einer Stimulation des EGFR beschreiben [Mao *et al.*, 1997]. Da die Phosphorylierung von PKP3 an Y195 durch die c-Src-Kinase katalysiert wird, wurde ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung des EGF-Rezeptors, der Aktivierung der c-Src-Kinase und der Phosphorylierung von PKP3 vermutet. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurde das Gesamtprotein EGF-behandelter epithelialer Zellen mit dem Sequenz-spezifischen Phospho-Antikörper untersucht, wobei jedoch keine Phosphorylierung von PKP3 an Y195 infolge der EGF-Behandlung nachgewiesen wurde (vgl. Abschn. 3.8). Selbst eine Anreicherung von PKP3 aus dem Gesamtprotein durch Immunpräzipitation führte nicht zu einem Nachweis dieser Phosphorylierung. Die Diskrepanz zu den Ergebnissen der massenspektrometrischen Analysen dürfte in der sehr viel höheren Sensitivität der MS-Methode liegen. Darüber hinaus scheint in diesem Zusammenhang erwähnenswert, dass die Aktivierung der c-Src-Kinase durch den EGFR zu deren Translokation an das Zytoskelett führt [van der Heyden *et al.*, 1997], wodurch unter Umständen Interaktionen zwischen PKP3 und der Kinase durch räumliche Trennung unwahrscheinlich werden. Falls die Phosphorylierung von PKP3 nur einen Seiteneffekt der Aktivierung der Kinase darstellt, so könnte dieser massenspektrometrisch sicherlich nachgewiesen werden, wäre per immunbiochemischer Detektion allerdings vermutlich nicht nachweisbar.

Die Phosphorylierung von PKP3 an Y195 wurde ebenfalls mit den Wachstumsfaktoren IGF-1 und HGF untersucht. Obwohl die Phosphorylierung weiterer Zell-Zell-Verbindungsproteine nach Aktivierung der korrespondierenden Rezeptor-Tyrosin-Kinasen IGFR-1 und c-Met gezeigt wurde [Shibamoto *et al.*, 1994; Playford *et al.*, 2000], konnte die Phosphorylierung von PKP3 am Tyrosin-Rest Y195 ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

4.5 Wasserstoff-Peroxid induziert die Phosphorylierung von PKP3 am Tyrosin-Rest Y195

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen als Nebenprodukt der aeroben Zellatmung oder werden als Reaktion auf äußere Stimuli durch spezifische Enzyme gebildet. ROS werden in geringen Konzentrationen durch ein fein abgestimmtes Gleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen Reaktionen von der Zelle toleriert. Pathologische Störungen dieses Gleichgewichts führen zur Schädigung von Nukleinsäuren, Proteinen und Lipiden und werden als oxidativer Stress bezeichnet. Interessanterweise existieren einzelne ROS, die als Signaltransduktions-Moleküle fungieren und zelluläre Signalwege aktivieren [Veal *et al.*, 2007].

Wasserstoff-Peroxid (H_2O_2) ist eines dieser zellulären Signalmoleküle, welches speziell durch NADPH-Oxidasen gebildet wird [Geiszt *et al.*, 2004]. Auslöser für die Bildung von H_2O_2 sind externe Stimuli, wie Zytokine und Wachstumsfaktoren (EGF, PDGF, Insulin und weitere), die zur Aktivierung der NADPH Oxidasen führen. Wasserstoff-Peroxid aktiviert über die Phosphatidylinositol-3-Kinasen und MAP-Kinasen verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden [Saksena *et al.*, 2008; Peus *et al.*, 1999; vgl. Abb. 3.29]. Da Wasserstoff-Peroxid ebenfalls mit der spezifischen Aktivierung von einzelnen Mitgliedern der Familie der Src-Kinasen, wie der c-Src-Kinase selber, in Verbindung gebracht oder nachgewiesen wurde [Abe *et al.*, 1999; Zhuang *et al.*, 2004; Veal *et al.*, 2007], wurde der Einfluss von Wasserstoff-Peroxid auf den Tyrosin-Rest Y195 untersucht. Bei der Analyse der Phosphorylierung von PKP3 am Tyrosin-Rest Y195 konnte erstaunlicherweise festgestellt werden, dass diese durch Wasserstoff-Peroxid induziert wird (siehe Abschn. 3.8.7). Hierbei konnte ebenfalls eine konzentrations-abhängige Hemmung durch bestimmte Src-Kinase-Inhibitoren festgestellt werden (siehe Abschn. 3.8.8), was die Vermutung nahelegt, dass einerseits c-Src durch Wasserstoff-Peroxid aktiviert wird, und andererseits die spezifische Phosphorylierung von PKP3 an Y195 durch die c-Src-Kinase katalysiert wird. Für die Aktivierung der c-Src-Kinase durch H_2O_2 vermuten Li *et al.* die Beteiligung der NADPH-Oxidasen Nox1 und Nox2, sowie der GTPase Rac1 [Li, *et al.*, 2008]. Die direkte Hemmung von Phospho-Tyrosin-Phosphatasen durch ROS ist in der Literatur ebenfalls beschrieben [Hecht *et al.*, 1992, Östmann *et al.*, 2011] und könnte in der hier beobachteten Modifikation von PKP3 auch von Bedeutung sein, ähnlich zur entsprechenden Hemmung bei einer Pervanadat-Behandlung.

Der Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies bzw. oxidativem Stress auf Zell-Adhäsionsproteine wurde bereits in einigen Arbeiten untersucht. 2002 berichteten Rao *et al.*, dass oxidativer Stress zur Umverteilung des E-Cadherin / β -Catenin-Komplexes aus Adhärenzverbindungen führt [Rao *et al.*, 2002]. Hierbei blieb der Komplex bestehen, allerdings wurde die Dissoziation von Aktin-Filamenten festgestellt. Die beobachteten Effekte wurden auf eine gesteigerte Tyrosin-Phosphorylierung der untersuchten Proteine zurückgeführt. Ähnliche Effekte beschrieben Inumaru *et al.* 2009. In dieser Arbeit wird die Aktivierung der c-Src-Kinase durch Wasserstoff-Peroxid in Kulturzellen beschrieben, was die Zunahme der Tyrosin-Phosphorylierungen von p120-Catenin bedingte [Inumaru *et al.*, 2009]. Die Phosphorylierung des Zell-Adhäsionsmoleküls führte zur Translokation von der Zellmembran in zytoplasmatische Aggregate und zur Verringerung der Adhäsion. Für die Auswirkungen von ROS auf die desmosomale Zelladhäsion sind keine Untersuchungen in der Literatur beschrieben. Es wurden lediglich die Einflüsse von - unter anderem - oxidativem Stress in epithelialen Kulturzellen auf die extra-desmosomalen Funktionen von PKP3 untersucht [Hofmann *et al.*, 2006].

4.6 Modulieren Phosphorylierungen ebenfalls die Eigenschaften von PKP3?

Bereits in initialen Studien wurde neben der primär desmosomalen Lokalisation von PKP3 ein Teil des Proteins im Zytoplasma [Schmidt *et al.*, 1999; Bonne *et al.*, 1999] ausgemacht. Spätere Arbeiten beschäftigten sich ausführlicher mit extra-desmosomalem PKP3, allerdings konnten keine Anhaltspunkte hinsichtlich der Regulation der subzellulären Verteilung gewonnen werden [Bonne *et al.*, 2003; Hofmann *et al.*, 2006]. Nach wie vor ist es nicht möglich, diese Dynamik zu erklären, allerdings liefern Arbeiten an PKP2 erstaunliche Hinweise. So konnte die nukleäre Translokation von PKP2 mit der spezifischen Phosphorylierung eines Serin-Restes in Verbindung gebracht werden [Müller *et al.*, 2003]. Hier führt die Serin-Phosphorylierung durch die C-TAK1-Kinase zur Bildung einer Bindedomäne für ein 14-3-3-Protein und damit zu einer Sequestrierung von PKP2 im Zytoplasma. Darüber hinaus ist der Einfluss von Phosphorylierungen im Kontext der desmosomalen Adhäsion relativ komplex. So zeigen Arbeiten an Plakoglobin ein vielschichtiges Regulationsmuster, bei welchem die Phosphorylierung unterschiedlicher Tyrosin-Reste einerseits stabilisierend und andererseits auch destabilisierend auf den desmosomalen Komplex wirken können [Yin *et al.*, 2004; Garrod *et al.*, 2008b].

Ob die Phosphorylierung von PKP3 ebenfalls einen Einfluss auf die subzelluläre Verteilung hat, sollte durch differentielle Extraktions-Experimente geklärt werden (siehe Abschn. 3.6). Zunächst wurde eine einfache Trennung in Triton X-100-lösliche und Triton X-100-unlösliche Fraktionen vorgenommen, und es konnte infolge der Inhibition der Tyrosin-Phosphatasen eine leichte Verschiebung von PKP3 in den löslichen Anteil beobachtet werden. Diese Beobachtungen wurden auch in differentiellen Extraktions-Experimenten mit Wasserstoff-Peroxid-behandelten Zellen gemacht (siehe Abschn. 3.8.9). Das veränderte Löslichkeits-Verhalten von PKP3 kann mit einer verringerten desmosomalen Assoziation erklärt werden, und obwohl beide Chemikalien nachweislich zu einer gesteigerten Tyrosin-Phosphorylierung von PKP3 führen, konnte nicht exakt aufgelöst werden, inwieweit diese Beobachtungen direkt mit der Phosphorylierung von PKP3 zusammenhängen. So konnten bereits Garrod *et al.* zeigen, dass Pervanadat zu einer erhöhten Tyrosin-Phosphorylierung von Desmoglein 2 und Plakoglobin führt, weshalb zumindest diese beiden Moleküle bei der Auswertung der gewonnenen Daten berücksichtigt werden müssen [Garrod *et al.*, 2008b]. Ob Wasserstoff-Peroxid ähnliche Effekte auf die desmosomalen Proteine hat, ist bisher unbekannt. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die Phosphorylierung des Tyrosin-Restes Y643 von Plakoglobin durch die c-Src-Kinase katalysiert wird und zu einer gesteigerten Affinität des Moleküls zu Desmoplakin führt [Miravet *et al.*, 2003]. Nachdem in dieser Arbeit die Aktivierung der c-Src-Kinase durch Wasserstoff-Peroxid nachgewiesen wurde, musste auch in diesen Experimenten von weiteren Effektormolekülen ausgegangen werden, die maßgeblich bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen.

Durch die Konstruktion von Tyrosin-Substitutions-Mutanten sollten diese Beobachtungen detaillierter untersucht werden, um den Einfluss einzelner Tyrosin-Reste hinsichtlich der PKP3-Eigenschaften aufzulösen. Die damit durchgeführten Extraktions-Experimente ergaben allerdings keine weiterführenden Erkenntnisse (siehe Abschn. 3.6.1). Der Austausch einzelner Tyrosin-Reste hatte keinen nachweisbaren Einfluss auf das Extraktionsverhalten von PKP3 oder konnte in diesem experimentellen Rahmen nicht aufgelöst werden. Geringfügige Unterschiede wurden allerdings mit der erzeugten Kombinationsmutante, die die Substitutionen an Y84, Y176, Y195, S196, Y210 und Y390 vereinigte, nachgewiesen. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Manipulation mehrerer Tyrosin-Reste durchaus Einfluss auf das Löslichkeits-Verhalten von PKP3 haben könnte. Funktionelle Rückschlüsse konnten auf Basis dieser Beobachtungen jedoch nicht getroffen werden und weitere Interpretationen wurden unter Berücksichtigung eventueller Änderungen der Tertiärstruktur

infolge der multiplen Mutationen erschwert. Eine exaktere Auflösung der Löslichkeitseffekte, die sich aus der Phosphorylierung von PKP3 oder dem selektiven Verlust einzelner Tyrosin-Reste ableiten, könnten unter Umständen durch verfeinerte Extraktionsexperimente erreicht werden. Hier sollte es das primäre Ziel sein, die Anzahl der isolierten Fraktionen selektiv zu erhöhen, um das Löslichkeitsverhalten der unterschiedlichen PKP3-Zustände (phosphoryliert, nicht-phosphoryliert, mutiert) besser aufzulösen.

4.7 Funktionelle Bedeutung der Phosphorylierung von PKP3 am Tyrosin-Rest Y195

Bislang konnte mit der Phosphorylierung des Tyrosin-Restes Y195 durch die c-Src-Kinase keine konkrete funktionelle Bedeutung assoziiert werden. Differentielle Extraktionsexperimente zum Nachweis von Y195-phosphoryliertem PKP3 konnten die Zusammenhänge zwischen Tyrosin-Phosphorylierung und PKP3-Löslichkeitsverhalten nicht exakter auflösen (siehe Abschn. 3.8.9). Obwohl Y195-phosphoryliertes PKP3 lediglich in den löslichen Fraktionen Wasserstoff-Peroxid behandelter Zellen nachgewiesen wurde, müssten weitere Faktoren als Ursache dieser Beobachtungen in Betracht gezogen werden. (1) Die c-Src-Kinase phosphoryliert weitere Tyrosin-Reste von PKP3. (2) Es kann nicht unterschieden werden, in welchem zeitlichen Zusammenhang die Tyrosin-Phosphorylierung und die Veränderung des Löslichkeitsverhaltens stehen (siehe Abschn. 3.8.9). (3) Die c-Src-Kinase phosphoryliert weitere desmosomale Proteine, was erheblichen Einfluss auf den desmosomalen Komplex hat [Yin *et al.*, 2004]. (4) Das breite und noch nicht vollständig aufgeklärte Reaktionsspektrum von Wasserstoff-Peroxid im zellulären Kontext lässt weitere bisher unbekannte Möglichkeiten offen [Veal *et al.*, 2007].

Dennoch scheint der durch die c-Src-Kinase induzierten Tyrosin-Phosphorylierung an den Desmosomen eine spezifische Bedeutung zuzukommen, die unmittelbare Konsequenzen auf die Eigenschaften von PKP3 hat. In diesem Zusammenhang soll nochmals auf die verstärkte Assoziation von Plakoglobin mit Desmoplakin hingewiesen werden, die durch die Aktivität der c-Src-Kinase reguliert wird [Miravet *et al.*, 2003]. Es kann hier vermutet werden, dass durch die erhöhte Einbindung von Plakoglobin in den Desmosomen PKP3 zumindest teilweise an der kompakten desmosomalen Struktur freigesetzt wird, wodurch ein Teil des unlöslichen PKP3 in die lösliche Fraktion übergeht. Ob bei dieser Reaktion die Tyrosin-Phosphorylierung von PKP3 eine relevante Funktion übernimmt, kann anhand der Ergebnisse bislang nicht abgeleitet werden. Dass sich diese Verlagerung nur an den Desmosomen abspielt,

wird durch die Detektion von Y195-phosphoryliertem PKP3 in c-Src-überexprimierenden Zellen deutlich (siehe Abschn. 3.11.2). Hier konnte phosphoryliertes PKP3 nach wie vor und ausschließlich im Bereich der Zellgrenzen nachgewiesen werden. Welche Auswirkungen diese Translokation auf die Stabilität der Desmosomen hat und inwieweit die Tyrosin-Phosphorylierung von PKP3 mit diesen Beobachtungen zusammenhängt, kann bisher nicht geklärt werden. Für die umfassende Interpretation der vorliegenden Ergebnisse sind weiterführende Interaktionsstudien am desmosomalen Komplex notwendig. In diesem Kontext sollte der Einfluss der Phosphorylierung von PKP3 auf die Assoziation mit anderen desmosomalen Proteinen untersucht werden. Ebenfalls scheint es vor dem Hintergrund des breiten Interaktions-Spektrums der c-Src-Kinase diskutabel, weitere desmosomale Komponenten hinsichtlich spezifischer Phosphorylierungs-Ereignisse zu analysieren.

Interessanterweise lieferte die immunhistochemische Färbung von Adenokarzinomen der Prostata erste Hinweise auf eine mögliche zellbiologische Relevanz der Phosphorylierung von PKP3 an Y195. Es gelang in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad des Adenokarzinoms die Phosphorylierungs-spezifische Variante von PKP3 mit dem polyklonalen Antikörper nachzuweisen (siehe Abschn. 3.12). Hierbei wurde Y195-phosphoryliertes PKP3 ausschließlich in einigen schlecht differenzierten Adenokarzinomen der Prostata detektiert. Obwohl die Färbungen in verschiedenen Tumoren ähnliche Tumorareale markieren, lässt sich anhand der bisherigen Daten noch keine Regelmäßigkeit ableiten, da der Nachweis der Phosphorylierung in hohem Maße von methodischen Faktoren, wie dem Ablauf bis zum Zeitpunkt der Fixierung oder der Gewebsgröße abzuhängen scheint.

Prostatakrebs ist die häufigste Neoplasie bei Männern und entsteht meist aus luminalen Epithelzellen. Die Krebszellen werden anhand ihrer Sensitivität gegenüber dem Steroidhormon Androgen charakterisiert, was entscheidend für die Therapie des Tumors ist.

Werden die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit berücksichtigt, so kann vermutet werden, dass die detektierte PKP3-Phosphorylierung in Prostata-Tumoren durch die c-Src-Kinase katalysiert wird. Obgleich der molekulare Hintergrund für die Entstehung von Adenokarzinomen der Prostata noch nicht verstanden ist, deuten doch einige *in vitro* Studien an abgeleiteten Zelllinien auf die onkogenen Eigenschaften der Src-Kinasen bei der Entwicklung dieses Tumors hin [Chang *et al.*, 2006]. Außerdem konnten unter Verwendung von Src-Kinase-Familie-Inhibitoren die malignen Phänotypen der jeweiligen Zelllinien

unterdrückt werden [Chang *et al.*, 2008; Recchia *et al.*, 2003]. Weitaus komplizierter gestaltet sich die Suche nach der spezifischen Aktivität einzelner Src-Kinase-Mitglieder in Adenokarzinomen der Prostata. Die Aktivität dieser Kinasen wird durch die Phosphorylierung eines zentralen Tyrosins reguliert. Dieser Bereich ist bei allen Mitgliedern der Familie hochkonserviert, weswegen spezifische Antikörper ebenfalls mit den aktiven Formen anderer Mitglieder der Src-Kinase Familie reagieren. So mangelt es den *in vitro* und *in vivo* Studien teilweise an der exakten Charakterisierung der katalysierenden bzw. aktiven Src-Kinase [vgl. Chang *et al.*, 2008 und Tatarov *et al.*, 2009].

Erstaunlicherweise wird im Rahmen der Progression von Prostatakrebs der Einfluss reaktiver Sauerstoff-Spezies diskutiert. So wurde bereits herausgefunden, dass in Androgen-sensitiven Prostatazellen über den Androgen-Rezeptor der Transkriptionsfaktor JunD aktiviert wird, der zur Erhöhung intrazellulärer reaktiver Sauerstoff-Spezies führt [Gupta-Elera *et al.*, 2012]. Inwieweit die Bildung dieser ROS zur Aktivierung der c-Src-Kinase führt, wurde in diesem Zusammenhang bisher nicht untersucht, scheint aber unter Berücksichtigung der in der vorliegenden Arbeit gewonnen Daten durchaus möglich.

Mit Hinblick auf die Ergebnisse der *in vivo* Studien lässt die Phosphorylierung von PKP3 an Y195 eine funktionelle Bedeutung vermuten, die allerdings durch die Analyse weiterer Gewebe und die Erhöhung der Fallzahl auf ein statistisch signifikantes Niveau bestätigt werden muss. Dass die Invasivität der Prostatatumoren mit der Expression von PKP3 korreliert, wurde durch die Arbeit von Breuninger *et al.* bereits nachgewiesen [Breuninger *et al.*, 2010]. Darüber hinaus zeigen weitere Arbeiten, dass PKP3 wahrscheinlich auch in anderen Tumoren eine signifikante Rolle zukommt. Hier wird PKP3 in Abhängigkeit vom untersuchten Gewebe zum Teil eine onkogene, aber auch eine tumorsuppressive Wirkung zugesprochen. So berichten Furukawa *et al.* von einer gesteigerten PKP3-Expression in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen [Furukawa *et al.*, 2005]. Die Autoren konnten die erhöhten PKP3-Level mit einer schlechteren Überlebensrate bei Patienten mit Lungenkrebs korrelieren. Immunhistochemische Färbungen an Mammakarzinomen bestätigen ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der erhöhten PKP3-Expression und den aggressiven Wachstumseigenschaften des Tumors [Demirag *et al.*, 2012]. Im Gegensatz zu diesen Studien deuten PKP3-Expressionanalysen an plattenepithelialen Kopf- und Halskarzinomen (SqCC) auf einen gegenteiligen Effekt hin. Hier nimmt die Expression von PKP3 mit steigendem Malignitätsgrad der Tumoren ab [Papagerakis *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2008]. Zu

ähnlichen Resultaten kommt die Arbeitsgruppe von Demirag *et al.* bei der Untersuchung von PKP3 an Magenkarzinomen [Demirag *et al.*, 2011]. Auch in diesem Fall führt der Verlust von PKP3 zur Progression des Tumors. Molekulare Grundlage für diese Beobachtungen könnte die transkriptionelle Unterdrückung von PKP3 durch den Transkriptionsfaktor ZEB1 sein, die bei Untersuchung von invasiven Tumorzellen festgestellt wurde [Aigner *et al.*, 2007]. Darüber hinaus zeigen die Arbeiten von Kundu *et al.*, dass der Verlust von PKP3 zu einer verminderten Zelladhäsion und einer Stimulation der neoplastischen Progression und Metastasierung führt [Kundu *et al.*, 2011]. Zusammenfassend weisen die bisherigen Arbeiten an verschiedenen Tumoren auf ein komplexes Zusammenspiel unterschiedlicher Faktoren hin und die exakte Funktion von PKP3 scheint in diesem Kontext vor allem vom untersuchten Gewebe abzuhängen. Ob und inwieweit die Phosphorylierung des Tyrosin-Restes Y195 bei diesen Beobachtungen eine relevante Schlüsselrolle einnimmt, wird sich in weiteren Experimenten zeigen.

5. Zusammenfassung

Die zelluläre Adhäsion stellt einen Eckpunkt für den evolutionären Erfolg mehrzelliger Organismen dar. Die Spezialisierung einzelner Zellen und das Entstehen komplexer funktioneller Einheiten manifestiert sich in verschiedensten Zell- und Gewebstypen. Desmosomen und Adhärenzverbindungen sind für die Bildung und Aufrechterhaltung dieser Gewebsstrukturen unerlässlich und ermöglichen auch deren funktionelle Dynamik. Eine wichtige strukturelle Komponente dieser Zell-Zell-Verbindungen sind Armadillo-Proteine. Diese fungieren allerdings nicht ausschließlich als Zelladhäsionsmoleküle, sondern übernehmen auch weitere zelluläre Aufgaben. Die verschiedenen funktionellen Eigenschaften der Armadillo-Proteine werden meist durch spezifische posttranslationale Modifikationen reguliert. Für einige Mitglieder der Proteinfamilie existieren bereits umfangreiche Studien, die sich mit der Dynamik der Moleküle infolge spezifischer Phosphorylierungen auseinandergesetzt haben. Regelmäßig wurden bei diesen Analysen Kinasen der Src-Familie und der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor als katalysierende Proteine identifiziert.

Im Zuge dieser Arbeit wurde das desmosomale Armadillo-Protein Plakophilin 3 auf das Vorhandensein von Proteinmodifikationen in normalen und Tumorzellen hin analysiert. Mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese (IEF) wurde gezeigt, dass Plakophilin 3 Ziel post-translationaler Modifikationen ist, die sich zumindest teilweise auf Tyrosin-Phosphorylierungen zurückführen ließen. Aus einer entsprechenden Datenbank von Phospho-Proteinen wurden für Plakophilin 3 fünf Tyrosin-Reste und ein Serin-Rest, die einerseits häufig in Phosphoanalysen nachgewiesen wurden und andererseits von Relevanz für die Funktion des Proteins sein könnten, ausgewählt. Diese sechs Aminosäure-Reste wurden in Mutagenese-Experimenten substituiert und zur Konstruktion von PKP3-Einzelmutanten und PKP3-Kombinationsmutanten verwendet. Epitheliale Zellen wurden mit diesen unterschiedlichen PKP3-Konstrukten stabil transfiziert und mittels Immunofluoreszenz-Färbung und differentieller Extraktion untersucht. Eine funktionelle Bedeutung hinsichtlich der PKP3-Eigenschaften einzelner Modifikationen konnte hierbei bislang nicht nachgewiesen werden.

Des weiteren wurden gegen die phosphorylierten Plakophilin 3-Sequenzen polyklonale Antiseren hergestellt. Aus einem der Seren konnten ausreichend sauber Phospho-spezifische Antikörper gegen den Tyrosin-Rest Y195 aufgereinigt werden. Mit Hilfe dieses Antikörpers wurde die Phosphorylierung von Plakophilin 3 an Y195 in *in-vivo* und *in-vitro* Experimenten

untersucht. Plakophilin 3 wurde dabei durch Einsatz spezifischer Kinase-Inhibitoren und in einem *in-vitro* Kinase-Assay als neues Substrat der c-Src-Kinase identifiziert. Hierbei wurde festgestellt, dass die Phosphorylierung dieses Tyrosin-Restes streng reguliert wird und erst durch den Einsatz des Tyrosin-Phosphatase-Inhibitors Pervanadat detektiert werden kann. Wachstumsfaktoren wie EGF, IGF-1 oder HGF führten erstaunlicherweise zu keiner Phosphorylierung des spezifischen Tyrosin-Restes. Allerdings konnte die Tyrosin-Phosphorylierung durch Stimulation der Zellen mit Wasserstoff-Peroxid induziert werden. Dies legt nahe, dass PKP3 ein Zielmolekül des Src-vermittelten Signalwegs darstellt, welches in Abhängigkeit von reaktiven Sauerstoff-Spezies und oxidativem Stress an Y195 phosphoryliert wird. Immunfluoreszenz-Färbungen an c-Src-überexprimierenden Zellen zeigten, dass Y195-phosphoryliertes PKP3 an der desmosomalen Struktur lokalisiert. An dieser Stelle sind allerdings weitere funktionelle Untersuchungen notwendig, da die Tyrosin-Phosphorylierung von Plakophilin 3 in einigen Versuchen mit einem veränderten zellulären Löslichkeitsverhalten in Verbindung zu stehen schien, wobei diese Beobachtung bisher nicht mit einer einzelnen, spezifischen Phosphorylierung korreliert werden konnte. Somit hat die vorliegende Studie erstmals für das desmosomale Protein Plakophilin 3 die Existenz einer spezifischen Tyrosin-Phosphorylierung und einen damit assoziierten Signalweg aufgezeigt, deren zellbiologische Relevanz in weiterführenden Experimenten zu klären ist.

Hinsichtlich maligner Tumoren konnte in früheren Arbeiten an Prostatakarzinomen ein höherer Malignitätsgrad sowohl mit einer erhöhten c-Src-Kinaseaktivität als auch mit einer gesteigerten Expression von Plakophilin 3 korreliert werden. Unter Berücksichtigung unserer experimentellen Daten wurden daraufhin Adenokarzinome der Prostata hinsichtlich des Auftretens der spezifischen Phosphorylierung von Plakophilin 3 immunhistochemisch untersucht. Hier wurde Y195-phosphoryliertes PKP3 in bestimmten Tumorarealen einiger schlecht differenzierter Adenokarzinome entlang von Zellgrenzen gefunden. Ob die untersuchte Modifikation unter Umständen eine diagnostische Relevanz hat, muss in weiterführenden Untersuchungen bestimmt werden.

5. Summary

Cellular adhesion is one hallmark accountable for the evolutionary success of multicellular organisms. Cellular specialization and the development of sophisticated functional units are reflected by the multiple kinds of cells and tissues. Desmosomes and adherens junctions are essential for the assembly and integrity of these tissues and facilitate - *inter alia* - their functional dynamics. Integral parts of both types of cell junctions are proteins of the armadillo family. Next to cellular adhesion, these proteins implement further cellular functions, which are mostly regulated by specific post-translational modifications. Detailed analyses of some of these proteins describe specific phosphorylation events related to the molecular dynamics. Several studies identified kinases of the Src-family and the epidermal growth factor receptor as responsible enzymes catalyzing reversible phosphorylation of armadillo proteins.

In this thesis the desmosomal armadillo protein plakophilin 3 (PKP3) was analyzed for protein modifications occurring in normal and tumor cells. Utilizing two-dimensional gel electrophoresis, it was shown that PKP3 is a target of post-translational modification events, and some of them could be attributed to phosphorylation of tyrosine residues. By screening a phosphotomic database we selected five tyrosine residues and one serine residue that were frequently detected in phosphorylation studies and that may be relevant for functional properties of PKP3. The selected amino acid residues were replaced by mutagenesis experiments and several PKP3 mutants were generated covering single or multiple mutations. Epithelial cells were stably transfected with these PKP3 constructs and analyzed by immunofluorescence staining and differential extraction. So far, the individual modifications studied did not result in a detectable change in PKP3 function or cellular behavior.

Furthermore, we generated polyclonal antisera against these phosphorylated PKP3 sequences. Purification of one of these sera revealed that it was suitable for further analyses. Using these antibodies, the phosphorylation of the tyrosine residue Y195 of PKP3 was analyzed by *in-vivo* and *in-vitro* experiments. By the application of specific kinase-inhibitors and *in-vitro* kinase assays we identified PKP3 as a new substrate of c-Src kinase. We found that phosphorylation of this tyrosine residue is tightly regulated and is only detectable after inhibition of cellular tyrosine phosphatases by pervanadate. Incubation of cells with common growth factors like EGF, IGF-1 or HGF surprisingly did not result in a detectable phosphorylation of this specific residue. Interestingly, phosphorylation of Y195 was induced by hydrogen peroxide treatment of cells. This suggests that this modification of PKP3 is at least part of a Src-mediated

signalling pathway which is dependent on reactive oxygen species and oxidative stress. Immunofluorescence staining of c-Src over-expressing cells detected Y195-phosphorylated PKP3 at the desmosomal structure. At this particular point further investigations seem to be necessary since tyrosine phosphorylation of PKP3 was associated with altered protein solubility in several experiments, and so far, these findings did not correlate with a specific phosphorylation of PKP3. In conclusion, the present study shows for the first time the existence of a specific tyrosine phosphorylation and an associated signaling pathway for the desmosomal protein PKP3, whose cell biological relevance has to be addressed in future experiments.

With regard to malignant tumors, the grade of malignancy of prostate carcinomas was previously correlated with an elevated activity of c-Src kinase and increased PKP3 expression. According to the results obtained in this thesis, adenocarcinomas of prostate were immunohistochemically analyzed for the presence of Y195-phosphorylated PKP3. The specific phosphorylation was found in some poorly differentiated adenocarcinomas at distinct tumour areas along cell borders. Further studies have to elucidate the functional relevance and if the specific PKP3 modification may achieve diagnostic significance.

6. Literatur

1. **Abe J, Okuda M, Huang Q, Yoshizumi M, Berk BC.** Reactive oxygen species activate p90 ribosomal S6 kinase via Fyn and Ras. *J Biol Chem* 2000;275:1739-1748
2. **Abram CL, Courtneidge SA.** Src family tyrosine kinases and growth factor signaling. *Exp Cell Res* 2000;254:1-13
3. **Aigner K, Descovich L, Mikula M, Sultan A, Dampier B, Bonn   S, van Roy F, Mikulits W, Schreiber M, Brabletz T, Sommergruber W, Schweifer N, Wernitznig A, Beug H, Foisner R, Eger A.** The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) represses Plakophilin 3 during human cancer progression. *FEBS Lett* 2007;581:1617-1624
4. **Alberts B, Johnson A, Lewis L, Raff M, Roberts K, Walter P.** Molecular Biology of the Cell. *Garland Science* 2008
5. **Alexander JJ, Bey EM, Geddes EW, Lecatsas G.** Establishment of a continuously growing cell line from primary carcinoma of the liver. *S Afr Med J* 1976;50:2124-2128
6. **Amar LS, Shabana AH, Oboeuf M, Martin N, Forest N.** Involvement of desmoplakin phosphorylation in the regulation of desmosomes by protein kinase C, in HeLa cells. *Cell Adhes Commun* 1999;7:125-138
7. **Anderson JM, Van Itallie CM, Fanning AS.** Setting up a selective barrier at the apical junction complex. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16:140-145
8. **Angst BD, Nilles LA, Green KJ.** Desmoplakin II expression is not restricted to stratified epithelia. *J Cell Sci* 1990;97:247-257
9. **Azaouagh A, Churzidse S, Konorza T, Erbel R.** Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: a review and update. *Clin Res Cardiol* 2011;100:383-394
10. **Balsamo J, Leung T, Ernst H, Zanin MK, Hoffman S, Lilien J.** Regulated binding of PTP1B-like phosphatase to N-cadherin: control of cadherin-mediated adhesion by dephosphorylation of beta-catenin. *J Cell Biol* 1996;134:801-813
11. **Barraclough J, Hodgkinson C, Hogg A, Dive C, Welman A.** Increases in c-Yes expression level and activity promote motility but not proliferation of human colorectal carcinoma cells. *Neoplasia* 2007;9:745-754
12. **Bass-Zubek AE, Hobbs RP, Amargo EV, Garcia NJ, Hsieh SN, Chen X, Wahl JK 3rd, Denning MF, Green KJ.** Plakophilin 2: a critical scaffold for PKC alpha that regulates intercellular junction assembly. *J Cell Biol* 2008;181:605-613
13. **Bertocchi C, Vaman Rao M, Zaidel-Bar R.** Regulation of adherens junction dynamics by phosphorylation switches. *J Signal Transduct* 2012:125295

14. **Birnboim HC, Doly J.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979;7:1513-1523
15. **Bizzozero G.** Delle cellule cigliate, del reticolo Malpighiano dell'epidermide. *Annal Univ Med* 1864;190:110-118
16. **Bizzozero G.** Osservazioni sulla struttura degli epiteli pavimentosi stratificati. *Rend R Ist Lomb* 1870;3:675
17. **Boggon TJ, Eck MJ.** Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* 2004;23:7918-7927
18. **Bolen JB, Veillette A, Schwartz AM, Deseau V, Rosen N.** Analysis of pp60c-src in human colon carcinoma and normal human colon mucosal cells. *Oncogene Res* 1987;1:149-168
19. **Bonné S, van Hengel J, van Roy F.** Chromosomal mapping of human armadillo genes belonging to the p120(ctn)/plakophilin subfamily. *Genomics* 1998;51:452-454
20. **Bonné S, van Hengel J, Nollet F, Kools P, van Roy F.** Plakophilin-3, a novel armadillo-like protein present in nuclei and desmosomes of epithelial cells. *J Cell Sci* 1999;112:2265-2276
21. **Bonné S, Gilbert B, Hatzfeld M, Chen X, Green KJ, van Roy F.** Defining desmosomal plakophilin-3 interactions. *J Cell Biol* 2003;161:403-416
22. **Bornslaeger EA, Godsel LM, Corcoran CM, Park JK, Hatzfeld M, Kowalczyk AP, Green KJ.** Plakophilin 1 interferes with plakoglobin binding to desmoplakin, yet together with plakoglobin promotes clustering of desmosomal plaque complexes at cell-cell borders. *J Cell Sci* 2001;114:727-738
23. **Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE.** Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 1988;106:761-771
24. **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254
25. **Breuninger S, Reidenbach S, Sauer CG, Ströbel P, Pfitzenmaier J, Trojan L, Hofmann I.** Desmosomal plakophilins in the prostate and prostatic adenocarcinomas: implications for diagnosis and tumor progression. *Am J Pathol* 2010;176:2509-2519
26. **Brunton VG, MacPherson IR, Frame MC.** Cell adhesion receptors, tyrosine kinases and actin modulators: a complex three-way circuitry. *Biochim Biophys Acta* 2004;1692:121-144

27. **Calautti E, Missero C, Stein PL, Ezzell RM, Dotto GP.** Fyn tyrosine kinase is involved in keratinocyte differentiation control. *Genes Dev* 1995;9:2279-2291
28. **Cam WR, Masaki T, Shiratori Y, Kato N, Ikenoue T, Okamoto M, Igarashi K, Sano T, Omata M.** Reduced C-terminal Src kinase activity is correlated inversely with pp60(c-src) activity in colorectal carcinoma. *Cancer* 2001;92:61-70
29. **Casagolda D, Del Valle-Pérez B, Valls G, Lugilde E, Vinyoles M, Casado-Vela J, Solanas G, Batlle E, Reynolds AB, Casal JI, de Herreros AG, Duñach M.** A p120-catenin-CK1epsilon complex regulates Wnt signaling. *J Cell Sci* 2010;123:2621-2631
30. **Chang YM, Bai L, Yang JC, Kung HJ, Evans CP.** Survey of Src activity and Src-related growth and migration in prostate cancer lines. *Proc Amer Assoc Cancer Res* 2006;47:2505a
31. **Chang YM, Bai L, Liu S, Yang JC, Kung HJ, Evans CP.** Src family kinase oncogenic potential and pathways in prostate cancer as revealed by AZD0530. *Oncogene* 2008;27:6365-6375
32. **Chen X, Bonne S, Hatzfeld M, van Roy F, Green KJ.** Protein binding and functional characterization of plakophilin 2. Evidence for its diverse roles in desmosomes and beta-catenin signaling. *J Biol Chem* 2002;277:10512-10522
33. **Chitaev NA, Leube RE, Troyanovsky RB, Eshkind LG, Franke WW, Troyanovsky SM.** The binding of plakoglobin to desmosomal cadherins: patterns of binding sites and topogenic potential. *J Cell Biol* 1996;133:359-369
34. **Choi HJ, Park-Snyder S, Pascoe LT, Green KJ, Weis WI.** Structures of two intermediate filament-binding fragments of desmoplakin reveal a unique repeat motif structure. *Nat Struct Biol* 2002;9:612-620
35. **Choi HJ, Weis WI.** Structure of the armadillo repeat domain of plakophilin 1. *J Mol Biol* 2005;346:367-376
36. **Chong LD, Daar IO.** Cloning Protein Tyrosine Kinases by Screening cDNA Libraries with Antiphosphotyrosine Antibodies. *Meth Mol Biol* 2000;124:21-37
37. **Culkins CC, Setzer SV.** Spotting desmosomes: the first 100 years. *J Invest Dermatol* 2007;127:E2-3
38. **Dbouk HA, Mroue RM, El-Sabban ME, Talhouk RS.** Connexins: a myriad of functions extending beyond assembly of gap junction channels. *Cell Commun Signal* 2009;7:4
39. **Demirag GG, Sullu Y, Gurgenyatagi D, Okumus NO, Yucel I.** Expression of plakophilins (PKP1, PKP2, and PKP3) in gastric cancers. *Diagn Pathol* 2011;6:1

40. **Demirag GG, Sullu Y, Yucel I.** Expression of Plakophilins (PKP1, PKP2, and PKP3) in breast cancers. *Med Oncol* 2012;29:1518-1522
41. **Desai BV, Harmon RM, Green KJ.** Desmosomes at a glance. *J Cell Sci* 2009;122:4401-4407
42. **Dusek RL, Godsel LM, Green KJ.** Discriminating roles of desmosomal cadherins: beyond desmosomal adhesion. *J Dermatol Sci* 2007;45:7-21
43. **Dusek RL, Attardi LD.** Desmosomes: new perpetrators in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 2011;11:317-323
44. **Dymecki SM, Niederhuber JE, Desiderio SV.** Specific expression of a tyrosine kinase gene, *blk*, in B lymphoid cells. *Science* 1990;247:332-336
45. **Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM.** The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 1998;273:29745-29753
46. **Farquhar MG and Palade GE.** JUNCTIONAL COMPLEXES IN VARIOUS EPITHELIA. *J Cell Biol* 1963;17:375-412
47. **Feng L, Zhou X, Liao J, Omary MB.** Pervanadate-mediated tyrosine phosphorylation of keratins 8 and 19 via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Cell Sci* 1999;112:2081-2090
48. **Fizazi K.** The role of Src in prostate cancer. *Ann Oncol* 2007;18:1765-1773
49. **Fogh J.** Human tumor cells in vitro. *Plenum Press* 1975
50. **Frank C, Burkhardt C, Imhof D, Ringel J, Zschörnig O, Wieligmann K, Zacharias M, Böhmer FD.** Effective dephosphorylation of Src substrates by SHP-1. *J Biol Chem* 2004;279:11375-11383
51. **Franke WW, Rickelt S, Barth M, Pieperhoff S.** The junctions that don't fit the scheme: special symmetrical cell-cell junctions of their own kind. *Cell Tissue Res* 2009;338:1-17
52. **Fuchs M, Müller T, Lerch MM, Ullrich A.** Association of human protein-tyrosine phosphatase kappa with members of the armadillo family. *J Biol Chem* 1996;271:16712-16719
53. **Furukawa C, Daigo Y, Ishikawa N, Kato T, Ito T, Tsuchiya E, Sone S, Nakamura Y.** Plakophilin 3 oncogene as prognostic marker and therapeutic target for lung cancer. *Cancer Res* 2005;65:7102-7110
54. **Garrod D, Chidgey M.** Desmosome structure, composition and function. *Biochim Biophys Acta* 2008a;1778:572-587

55. **Garrod D, Fisher C, Smith A, Nie Z.** Pervanadate stabilizes desmosomes. *Cell Adh Migr* 2008b;2:161–166
56. **Gaudry CA, Palka HL, Dusek RL, Huen AC, Khandekar MJ, Hudson LG, Green KJ.** Tyrosine-phosphorylated plakoglobin is associated with desmogleins but not desmoplakin after epidermal growth factor receptor activation. *J Biol Chem* 2001;276:24871-24880
57. **Gaunt SJ, Subak-Sharpe JH.** Selectivity in metabolic cooperation between cultured mammalian cells. *Exp Cell Res* 1979;120:307-320
58. **Geiszt M, Leto TL.** The Nox family of NAD(P)H oxidases: host defense and beyond. *J Biol Chem* 2004;279:51715-51718
59. **Gerull B, Heuser A, Wichter T, Paul M, Basson CT, McDermott DA, Lerman BB, Markowitz SM, Ellinor PT, MacRae CA, Peters S, Grossmann KS, Drenckhahn J, Michely B, Sasse-Klaassen S, Birchmeier W, Dietz R, Breithardt G, Schulze-Bahr E, Thierfelder L.** Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Nat Genet* 2004;36:1162-1164
60. **Getsios S, Huen AC, Green KJ.** Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:271-281
61. **Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP.** In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 1973;51:1417-1423
62. **Giepmans BN.** Role of connexin43-interacting proteins at gap junctions. *Adv Cardiol* 2006;42:41-56
63. **Gille J, Khalik M, König V, Kaufmann R.** Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) induces vascular permeability factor (VPF/VEGF) expression by cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1998;111:1160-1165
64. **Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL.** Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem* 1996;65:475-502
65. **Green KJ, Getsios S, Troyanovsky S, Godsel LM.** Intercellular Junction Assembly, Dynamics, and Homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2:a000125
66. **Grossmann KS, Grund C, Huelsken J, Behrend M, Erdmann B, Franke WW, Birchmeier W.** Requirement of plakophilin 2 for heart morphogenesis and cardiac junction formation. *J Cell Biol* 2004;167:149-160

67. **Guo A, Villén J, Kornhauser J, Lee KA, Stokes MP, Rikova K, Possemato A, Nardone J, Innocenti G, Wetzel R, Wang Y, MacNeill J, Mitchell J, Gygi SP, Rush J, Polakiewicz RD, Comb MJ.** Signaling networks assembled by oncogenic EGFR and c-Met. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:692-697
68. **Gupta-Elera G, Garrett AR, Robison RA, O'Neill KL.** The role of oxidative stress in prostate cancer. *Eur J Cancer Prev* 2012;21:155-162
69. **Harari PM.** Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocr Relat Cancer* 2004;11:689-708
70. **Harlow DL.** Antibodies: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory* 1988:72-87
71. **Harris TJ, Tepass U.** Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11:502-514
72. **Hatzfeld M, Haffner C, Schulze K, Vinzens U.** The function of plakophilin 1 in desmosome assembly and actin filament organization. *J Cell Biol* 2000;149:209-222
73. **Hatzfeld M.** The p120 family of cell adhesion molecules. *Eur J Cell Biol* 2005;84:205-214
74. **Hatzfeld M.** Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion? *Biochim Biophys Acta* 2007;1773:69-77
75. **Hecht D, Zick Y.** Selective inhibition of protein tyrosine phosphatase activities by H₂O₂ and vanadate in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;188:773-779
76. **Heibeck TH, Ding SJ, Opresko LK, Zhao R, Schepmoes AA, Yang F, Tolmachev AV, Monroe ME, Camp DG 2nd, Smith RD, Wiley HS, Qian WJ.** An extensive survey of tyrosine phosphorylation revealing new sites in human mammary epithelial cells. *J Proteome Res* 2009;8:3852-3861
77. **Heid HW, Schmidt A, Zimbelmann R, Schäfer S, Winter-Simanowski S, Stumpp S, Keith M, Figge U, Schnölzer M, Franke WW.** Cell type-specific desmosomal plaque proteins of the plakoglobin family: plakophilin 1 (band 6 protein). *Differentiation* 1994;58:113-131
78. **Hobmayer E, Hatta M, Fischer R, Fujisawa T, Holstein TW, Sugiyama T.** Identification of a Hydra homologue of the beta-catenin/plakoglobin/armadillo gene family. *Gene* 1996;172:155-159

79. **Hofmann I, Casella M, Schnölzer M, Schlechter T, Spring H, Franke WW.** Identification of the junctional plaque protein plakophilin 3 in cytoplasmic particles containing RNA-binding proteins and the recruitment of plakophilins 1 and 3 to stress granules. *Mol Biol Cell* 2006;17:1388-1398
80. **Holthöfer B, Windoffer R, Troyanovsky S, Leube RE.** Structure and function of desmosomes. *Int Rev Cytol* 2007;264:65-163
81. **Hu P, Berkowitz P, O'Keefe EJ, Rubenstein DS.** Keratinocyte adherens junctions initiate nuclear signaling by translocation of plakoglobin from the membrane to the nucleus. *J Invest Dermatol* 2003;121:242-251
82. **Huber AH, Nelson WJ, Weis WI.** Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* 1997;90:871-882
83. **Huyer G, Liu S, Kelly J, Moffat J, Payette P, Kennedy B, Tsaprailis G, Gresser MJ, Ramachandran C.** Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. *J Biol Chem* 1997;272:843-851
84. **Inumaru J, Nagano O, Takahashi E, Ishimoto T, Nakamura S, Suzuki Y, Niwa S, Umezawa K, Tanihara H, Saya H.** Molecular mechanisms regulating dissociation of cell-cell junction of epithelial cells by oxidative stress. *Genes Cells* 2009;14:703-716
85. **Irby RB, Mao W, Coppola D, Kang J, Loubeau JM, Trudeau W, Karl R, Fujita DJ, Jove R, Yeatman TJ.** Activating SRC mutation in a subset of advanced human colon cancers. *Nat Genet* 1999;21:187-190
86. **Kedersha N, Anderson P.** Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem Soc Trans* 2002;30:963-969
87. **Khapare N, Kundu ST, Sehgal L, Sawant M, Priya R, Gosavi P, Gupta N, Alam H, Karkhanis M, Naik N, Vaidya MM, Dalal SN.** Plakophilin3 loss leads to an increase in PRL3 levels promoting K8 dephosphorylation, which is required for transformation and metastasis. *PLoS One* 2012;7:e38561
88. **Kirchner F, Schuetz A, Boldt LH, Martens K, Dittmar G, Haverkamp W, Thierfelder L, Heinemann U, Gerull B.** Molecular insights into arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by plakophilin-2 missense mutations. *Circ Cardiovasc Genet* 2012;5:400-411
89. **Klymkowsky MW.** Plakophilin, armadillo repeats, and nuclear localization. *Microsc Res Tech* 1999;45:43-54

90. **Koch A, Thiemann M, Grabenbauer M, Yoon Y, McNiven MA, Schrader M.** Dynamin-like protein 1 is involved in peroxisomal fission. *J Biol Chem* 2003;278:8597-8605
91. **Kowalczyk AP, Bornslaeger EA, Borgwardt JE, Palka HL, Dhaliwal AS, Corcoran CM, Denning MF, Green KJ.** The amino-terminal domain of desmoplakin binds to plakoglobin and clusters desmosomal cadherin-plakoglobin complexes. *J Cell Biol* 1997;139:773-784
92. **Kundu ST, Gosavi P, Khapare N, Patel R, Hosing AS, Maru GB, Ingle A, Decaprio JA, Dalal SN.** Plakophilin3 downregulation leads to a decrease in cell adhesion and promotes metastasis. *Int J Cancer* 2008;123:2303-2314
93. **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685
94. **Lee CH, Hung HW, Hung PH, Shieh YS.** Epidermal growth factor receptor regulates beta-catenin location, stability, and transcriptional activity in oral cancer. *Mol Cancer* 2010;9:64
95. **Lewis JE, Wahl JK 3rd, Sass KM, Jensen PJ, Johnson KR, Wheelock MJ.** Cross-talk between adherens junctions and desmosomes depends on plakoglobin. *J Cell Biol* 1997;136:919-934
96. **Li Q, Zhang Y, Marden JJ, Banfi B, Engelhardt JF.** Endosomal NADPH oxidase regulates c-Src activation following hypoxia/reoxygenation injury. *Biochem J* 2008;411:531-541
97. **Lilien J, Balsamo J.** The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin. *Curr Opin Cell Biol* 2005;17:459-465
98. **Lorch JH, Klessner J, Park JK, Getsios S, Wu YL, Stack MS, Green KJ.** Epidermal growth factor receptor inhibition promotes desmosome assembly and strengthens intercellular adhesion in squamous cell carcinoma cells. *J Biol Chem* 2004;279:37191-37200
99. **Maeda O, Usami N, Kondo M, Takahashi M, Goto H, Shimokata K, Kusugami K, Sekido Y.** Plakoglobin (gamma-catenin) has TCF/LEF family-dependent transcriptional activity in beta-catenin-deficient cell line. *Oncogene* 2004;23:964-972
100. **Mao W, Irby R, Coppola D, Fu L, Wloch M, Turner J, Yu H, Garcia R, Jove R, Yeatman TJ.** Activation of c-Src by receptor tyrosine kinases in human colon cancer cells with high metastatic potential. *Oncogene* 1997;15:3083-3090

101. **Mariner DJ, Davis MA, Reynolds AB.** EGFR signaling to p120-catenin through phosphorylation at Y228. *J Cell Sci* 2004;117:1339-1350
102. **McGrath JA, McMillan JR, Shemanko CS, Runswick SK, Leigh IM, Lane EB, Garrod DR, Eady RA.** Mutations in the plakophilin 1 gene result in ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome. *Nat Genet* 1997;17:240-244
103. **McGrath JA, Hoeger PH, Christiano AM, McMillan JR, Mellerio JE, Ashton GH, Dopping-Hepenstal PJ, Lake BD, Leigh IM, Harper JI, Eady RA.** Skin fragility and hypohidrotic ectodermal dysplasia resulting from ablation of plakophilin 1. *Br J Dermatol* 1999;140:297-307
104. **McMillan JR, Haftek M, Akiyama M, South AP, Perrot H, McGrath JA, Eady RA, Shimizu H.** Alterations in desmosome size and number coincide with the loss of keratinocyte cohesion in skin with homozygous and heterozygous defects in the desmosomal protein plakophilin 1. *J Invest Dermatol* 2003;121:96-103
105. **Meloche S, Seuwen K, Pages G, Pouyssegur J.** Biphasic and synergistic activation of p44mapk (ERK1) by growth factors: correlation between late phase activation and mitogenicity. *Mol Endocrinol* 1992;6:845-854
106. **Meng W, Takeichi M.** Adherens Junction: Molecular Architecture and Regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;1:a002899
107. **Mertens C, Kuhn C, Franke WW.** Plakophilins 2a and 2b: constitutive proteins of dual location in the karyoplasm and the desmosomal plaque. *J Cell Biol* 1996;135:1009-1025
108. **Mertens C, Hofmann I, Wang Z, Teichmann M, Sepehri Chong S, Schnölzer M, Franke WW.** Nuclear particles containing RNA polymerase III complexes associated with the junctional plaque protein plakophilin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:7795-7800
109. **Miravet S, Piedra J, Castaño J, Raurell I, Francí C, Duñach M, García de Herreros A.** Tyrosine phosphorylation of plakoglobin causes contrary effects on its association with desmosomes and adherens junction components and modulates beta-catenin-mediated transcription. *Mol Cell Biol* 2003;23:7391-7402
110. **Mizuno H, Cho YY, Ma WY, Bode AM, Dong Z.** Effects of MAP kinase inhibitors on epidermal growth factor-induced neoplastic transformation of human keratinocytes. *Mol Carcinog* 2006;45:1-9
111. **Mruk DD, Cheng CY.** Desmosomes in the testis: Moving into an uncharted territory. *Spermatogenesis* 2011;1:47-51

112. **Mueller H, Franke WW.** Biochemical and immunological characterization of desmoplakins I and II, the major polypeptides of the desmosomal plaque. *J Mol Biol* 1983;163:647-671
113. **Müller J, Ritt DA, Copeland TD, Morrison DK.** Functional analysis of C-TAK1 substrate binding and identification of PKP2 as a new C-TAK1 substrate. *EMBO J* 2003;22:4431-4442
114. **Nelson WJ.** Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature* 2003;422:766-774
115. **Nelson WJ, Nusse R.** Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 2004;303:1483-1487
116. **Neuber S, Mühmer M, Wratten D, Koch PJ, Moll R, Schmidt A.** The desmosomal plaque proteins of the plakophilin family. *Dermatol Res Pract* 2010;101452
117. **Niessen CM.** Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol* 2007;127:2525-2532
118. **Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A, Kitano H.** A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol* 2005;1:0010
119. **Okada TS.** The path leading to the discovery of cadherin: In retrospect. *Dev Growth Differ* 1996;38:583–596
120. **Ozawa M, Ohkubo T.** Tyrosine phosphorylation of p120(ctn) in v-Src transfected L cells depends on its association with E-cadherin and reduces adhesion activity. *J Cell Sci* 2001;114:503-512
121. **Papagerakis S, Shabana AH, Depondt J, Gehanno P, Forest N.** Immunohistochemical localization of plakophilins (PKP1, PKP2, PKP3, and p0071) in primary oropharyngeal tumors: correlation with clinical parameters. *Hum Pathol* 2003;34:565-572
122. **Pasquale EB, Singer SJ.** Identification of a developmentally regulated protein-tyrosine kinase by using anti-phosphotyrosine antibodies to screen a cDNA expression library. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:5449-5453
123. **Peifer M, McCrea PD, Green KJ, Wieschaus E, Gumbiner BM.** The vertebrate adhesive junction proteins beta-catenin and plakoglobin and the Drosophila segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties. *J Cell Biol* 1992;118:681-691

124. **Perlmutter RM, Marth JD, Lewis DB, Steven RP, Ziegler F, Wilson CB.** Structure and expression of Ick transcripts in human lymphoid cells. *J Cell Biochem* 1988;38:117-126
125. **Peus D, Vasa RA, Beyerle A, Meves A, Krautmacher C, Pittelkow MR.** UVB activates ERK1/2 and p38 signaling pathways via reactive oxygen species in cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1999;112:751-756
126. **Piedra J, Miravet S, Castaño J, Pálmer HG, Heisterkamp N, García de Herreros A, Duñach M.** p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin Interaction. *Mol Cell Biol* 2003;23:2287-2297
127. **Pieters T, van Roy F, van Hengel J.** Functions of p120ctn isoforms in cell-cell adhesion and intracellular signaling. *Front Biosci* 2012;17:1669-1694
128. **Pietras K, Sjöblom T, Rubin K, Heldin CH, Ostman A.** PDGF receptors as cancer drug targets. *Cancer Cell* 2003;3:439-443
129. **Playford MP, Bicknell D, Bodmer WF, Macaulay VM.** Insulin-like growth factor 1 regulates the location, stability, and transcriptional activity of beta-catenin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:12103-12108
130. **Pokutta S, Herrenknecht K, Kemler R, Engel J.** Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding. *Eur J Biochem* 1994;223:1019-1026
131. **Posadas EM, Al-Ahmadie H, Robinson VL, Jagadeeswaran R, Otto K, Kasza KE, Tretiakov M, Siddiqui J, Pienta KJ, Stadler WM, Rinker-Schaeffer C, Salgia R.** FYN is overexpressed in human prostate cancer. *BJU Int* 2009;103:171-177
132. **Quintrell N, Lebo R, Varmus H, Bishop JM, Pettenati MJ, Le Beau MM, Diaz MO, Rowley JD.** Identification of a human gene (HCK) that encodes a protein-tyrosine kinase and is expressed in hemopoietic cells. *Mol Cell Biol* 1987;7:2267-2275
133. **Rao RK, Basuroy S, Rao VU, Karnaky Jr KJ, Gupta A.** Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin-beta-catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. *Biochem J* 2002;368:471-481
134. **Ratcliffe MJ, Rubin LL, Staddon JM.** Dephosphorylation of the cadherin-associated p100/p120 proteins in response to activation of protein kinase C in epithelial cells. *J Biol Chem* 1997;272:31894-31901

135. **Recchia I, Rucci N, Festuccia C, Bologna M, MacKay AR, Migliaccio S, Longo M, Susa M, Fabbro D, Teti A.** Pyrrolopyrimidine c-Src inhibitors reduce growth, adhesion, motility and invasion of prostate cancer cells in vitro. *Eur J Cancer* 2003;39:1927-1935
136. **Reynolds AB, Herbert L, Cleveland JL, Berg ST, Gaut JR.** p120, a novel substrate of protein tyrosine kinase receptors and of p60v-src, is related to cadherin-binding factors beta-catenin, plakoglobin and armadillo. *Oncogene* 1992;7:2439-2445
137. **Rider LG, Raben N, Miller L, Jelsema C.** The cDNAs encoding two forms of the LYN protein tyrosine kinase are expressed in rat mast cells and human myeloid cells. *Gene* 1994;138:219-222
138. **Roberts J, Herkert J, Rutberg J, Nikkel S, Wiesfeld A, Dooijes D, Gow R, van Tintelen J, Gollob M.** Detection of genomic deletions of PKP2 in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Clin Genet* 2012;01950:1399-0004
139. **Roura S, Miravet S, Piedra J, García de Herreros A, Duñach M.** Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 1999;274:36734-36740
140. **Saito YD, Jensen AR, Salgia R, Posadas EM.** Fyn: a novel molecular target in cancer. *Cancer* 2010;116:1629-1637
141. **Saksena S, Gill RK, Tyagi S, Alrefai WA, Ramaswamy K, Dudeja PK.** Role of Fyn and PI3K in H₂O₂-induced inhibition of apical Cl⁻/OH⁻ exchange activity in human intestinal epithelial cells. *Biochem J* 2008;416:99-108
142. **Schmidt A, Heid HW, Schäfer S, Nuber UA, Zimbelmann R, Franke WW.** Desmosomes and cytoskeletal architecture in epithelial differentiation: cell type-specific plaque components and intermediate filament anchorage. *Eur J Cell Biol* 1994;65:229-245
143. **Schmidt A, Langbein L, Rode M, Prätzel S, Zimbelmann R, Franke WW.** Plakophilins 1a and 1b: widespread nuclear proteins recruited in specific epithelial cells as desmosomal plaque components. *Cell Tissue Res* 1997;290:481-499
144. **Schmidt A, Langbein L, Prätzel S, Rode M, Rackwitz HR, Franke WW.** Plakophilin 3--a novel cell-type-specific desmosomal plaque protein. *Differentiation* 1999;64:291-306
145. **Schmidt A, Jäger S.** Plakophilins--hard work in the desmosome, recreation in the nucleus? *Eur J Cell Biol* 2005;84:189-204

146. **Schwarz J, Ayim A, Schmidt A, Jäger S, Koch S, Baumann R, Dünne AA, Moll R.** Differential expression of desmosomal plakophilins in various types of carcinomas: correlation with cell type and differentiation. *Hum Pathol* 2006;37:613-622
147. **Shibamoto S, Hayakawa M, Takeuchi K, Hori T, Oku N, Miyazawa K, Kitamura N, Takeichi M, Ito F.** Tyrosine phosphorylation of beta-catenin and plakoglobin enhanced by hepatocyte growth factor and epidermal growth factor in human carcinoma cells. *Cell Adhes Commun* 1994;1:295-305
148. **Sivamani K, Garcia MS, Isseroff RR.** Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. *Front Biosci* 2007;12:2849-2868
149. **Sklyarova T, Bonn   S, D'Hooge P, Denecker G, Goossens S, De Rycke R, Borgonie G, B  sl M, van Roy F, van Hengel J.** Plakophilin-3-deficient mice develop hair coat abnormalities and are prone to cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol* 2008;128:1375-1385
150. **Skoudy A, Llosas MD, García de Herreros A.** Intestinal HT-29 cells with dysfunction of E-cadherin show increased pp60src activity and tyrosine phosphorylation of p120-catenin. *Biochem J* 1996;317:279-284
151. **Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, van der Bliek AM.** Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 2001;12:2245-2256
152. **Sobolik-Delmaire T, Katafiasz D, Wahl JK 3rd.** Carboxyl terminus of Plakophilin-1 recruits it to plasma membrane, whereas amino terminus recruits desmoplakin and promotes desmosome assembly. *J Biol Chem* 2006;281:16962-16970
153. **Sobolik-Delmaire T, Reddy R, Pashaj A, Roberts BJ, Wahl JK 3rd.** Plakophilin-1 localizes to the nucleus and interacts with single-stranded DNA. *J Invest Dermatol* 2010;130:2638-2646
154. **Stappenbeck TS, Lamb JA, Corcoran CM, Green KJ.** Phosphorylation of the desmoplakin COOH terminus negatively regulates its interaction with keratin intermediate filament networks. *J Biol Chem* 1994;269:29351-29354
155. **Summy JM, Gallick GE.** Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2003;22:337-358
156. **Takeichi M.** The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* 1988;102:639-655

157. **Tatarov O, Mitchell TJ, Seywright M, Leung HY, Brunton VG, Edwards J.** SRC family kinase activity is up-regulated in hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:3540-3549
158. **Thomas SM, Brugge JS.** Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997;13:513-609
159. **Thomason HA, Cooper NH, Ansell DM, Chiu M, Merrit AJ, Hardman MJ, Garrod DR.** Direct evidence that PKC α positively regulates wound re-epithelialization: correlation with changes in desmosomal adhesiveness. *J Pathol* 2012;227:346-356
160. **Van der Heyden MA, Oude Weernink PA, Van Oirschot BA, Van Bergen en Henegouwen PM, Boonstra J, Rijksen G.** Epidermal growth factor-induced activation and translocation of c-Src to the cytoskeleton depends on the actin binding domain of the EGF-receptor. *Biochim Biophys Acta* 1997;1359:211-221
161. **Van Itallie CM, Anderson JM.** Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol* 2006;68:403-429
162. **Veal EA, Day AM, Morgan BA.** Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell* 2007;26:1-14
163. **Wahl JK, Sacco PA, McGranahan-Sadler TM, Sauppé LM, Wheelock MJ, Johnson KR.** Plakoglobin domains that define its association with the desmosomal cadherins and the classical cadherins: identification of unique and shared domains. *J Cell Sci* 1996;109:1143-1154
164. **Weiner TM, Liu ET, Craven RJ, Cance WG.** Expression of focal adhesion kinase gene and invasive cancer. *Lancet* 1993;342:1024-1025
165. **Wilson HV.** On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges. *J Exp Zool* 1907;5:245-258
166. **Wolf A, Krause-Gruszczynska M, Birkenmeier O, Ostareck-Lederer A, Hüttelmaier S, Hatzfeld M.** Plakophilin 1 stimulates translation by promoting eIF4A1 activity. *J Cell Biol* 2010;188:463-471
167. **Wolf-Yadlin A, Hautaniemi S, Lauffenburger DA, White FM.** Multiple reaction monitoring for robust quantitative proteomic analysis of cellular signaling networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:5860-5865
168. **Wong EY, Morgan L, Smales C, Lang P, Gubby SE, Staddon JM.** Vascular endothelial growth factor stimulates dephosphorylation of the catenins p120 and p100 in endothelial cells. *Biochem J* 2000;346:209-216

169. **Xia X, Mariner DJ, Reynolds AB.** Adhesion-associated and PKC-modulated changes in serine/threonine phosphorylation of p120-catenin. *Biochemistry* 2003;42:9195-9204
170. **Xu G, Craig AW, Greer P, Miller M, Anastasiadis PZ, Lilien J, Balsamo J.** Continuous association of cadherin with beta-catenin requires the non-receptor tyrosine-kinase Fer. *J Cell Sci* 2004;117:3207-3219
171. **Yeatman TJ.** A renaissance for SRC. *Nat Rev Cancer* 2004;4:470-480
172. **Yin T, Green KJ.** Regulation of desmosome assembly and adhesion. *Semin Cell Dev Biol* 2004;15:665-677
173. **Ylä-Outinen H.** NF1 TUMOR SUPPRESSOR IN SKIN. *Acta Univ Oul* 2002;669
174. **Zhang W, Lee JC, Kumar S, Gowen M.** ERK pathway mediates the activation of Cdk2 in IGF-1-induced proliferation of human osteosarcoma MG-63 cells. *J Bone Miner Res* 1999;14:528-535
175. **Zhang Y, Wolf-Yadlin A, Ross PL, Pappin DJ, Rush J, Lauffenburger DA, White FM.** Time-resolved mass spectrometry of tyrosine phosphorylation sites in the epidermal growth factor receptor signaling network reveals dynamic modules. *Mol Cell Proteomics* 2005;4:1240-1250
176. **Zhu K, Zhao J, Lubman DM, Miller FR, Barder TJ.** Protein pI shifts due to posttranslational modifications in the separation and characterization of proteins. *Anal Chem* 2005;77:2745-2755
177. **Zhuang S, Schnellmann RG.** H₂O₂-induced transactivation of EGF receptor requires Src and mediates ERK1/2, but not Akt, activation in renal cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;286:F858-865
178. **Ziegler SF, Marth JD, Lewis DB, Perlmutter RM.** Novel protein-tyrosine kinase gene (hck) preferentially expressed in cells of hematopoietic origin. *Mol Cell Biol* 1987;7:2276-2285

Erklärung

Hiermit versichere ich, Steffen Neuber, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

Posttranslationale Modifikation und subzelluläre Verteilung von Plakophilin 3 in normalen und Tumorzellen

selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen Form oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Steffen Neuber

Marburg / Lahn, Februar 2013

Publikationen und Kongresse

Neuber S, Mühmer M, Wratten D, Koch PJ, Moll R, Schmidt A. The desmosomal plaque proteins of the plakophilin family. *Dermatol Res Pract* 2010;2010:101452

Steffen Neuber, Merle Meyer, Viktoria Wischmann, Roland Moll and Ansgar Schmidt. c-Src mediated Phosphorylation at Tyr-195 of desmosomal Plakophilin 3 is induced by ROS but independent of Stimulation with Growth Factors (in Vorbereitung)

Neuber S., Meyer M., Wischmann V., Moll R., Schmidt A. Plakophilin 3 is phosphorylated at Y195 by reactive oxygen species (ROS)-activated c-Src kinase but not by growth factors. International AEK Cancer Congress 2013, Heidelberg, Germany (Posterbeitrag, in Vorbereitung)

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Steffen Neuber
Geboren am: 30.04.1984 in Frankenberg / Sachsen

Schulausbildung

09/ 1990 - 06/ 1994 Karl-Marx Grundschule Flöha
09/ 1994 - 06/ 2002 Samuel-von-Pufendorf-Gymnasium Flöha

Grundwehrdienst

07/ 2002 - 03/ 2003 Sanitätsdienst der Bundeswehr

Studium

10/ 2003 - 03/ 2005 Grundstudium Biologie an der Universität Jena
04/ 2005 - 03/ 2009 Hauptstudium Biologie an der Universität Jena mit den Schwerpunkten Mikro- und Infektionsbiologie

Diplomarbeit Universitätsklinikum Jena, Institut für Virologie und Antivirale Therapie, Prof. Dr. Wutzler

Thema: *in vivo* und *in vitro* Studien zur Charakterisierung der RNA-Protein-Interaktion zwischen zellulärem Poly(rC)-bindenden Protein 2 und Cocksackievirus B3-RNA, 02/ 2009

Dissertation

05/ 2009 – 02/ 2013 Philipps-Universität Marburg, Institut für Pathologie, Prof. Dr. Moll

Thema: Posttranslationale Modifikation und subzelluläre Verteilung von Plakophilin 3 in normalen und Tumorzellen